Translation Translation

09700148

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P81399PC-Zie	FOR FURTHER ACT	TION See Notific	eation of Transmittal of International Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/01471	International filing date 10 May 1999		Priority date (day/month/year) 12 May 1998 (12.05.98)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68				
Applicant	Applicant BIOINSIDE GMBH			
This international preliminary exa Authority and is transmitted to the a	mination report has bee	n prepared by this icle 36.	International Preliminary Examining	
2. This REPORT consists of a total of	5 sheets, i	ncluding this cover s	heet.	
heen amended and are the b				
These annexes consist of a	total of sh	neets.		
This report contains indications relations	3. This report contains indications relating to the following items:			
I Basis of the repor	I Basis of the report			
II Priority				
III Non-establishmer	nt of opinion with regard t	to novelty, inventive	step and industrial applicability	
IV \(\sum_{\text{lack of unity of i}}	nvention			
V Reasoned stateme	ent under Article 35(2) wi lanations supporting such	th regard to novelty, statement	inventive step or industrial applicability;	
VI Certain documen	ts cited			
VII Certain defects in	the international applicat	tion		
VIII Certain observati	ons on the international a	pplication		
Date of submission of the demand		Date of completion	of this report	
10 December 1999 (10	0.12.99)	15 Se	eptember 2000 (15.09.2000)	
Name and mailing address of the IPEA/EF	•	Authorized officer		
Facsimile No.		Telephone No.		

International application No.

PCT/DE99/01471

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

I. Basis o						
1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):						
		the international	application as o	riginally filed.		
	X	the description,	pages	1-52	, as originally filed,	
_					, filed with the demand,	
			pages		_, filed with the letter of _	
[X	the claims,			_, as originally filed,	
			Nos		_ , as amended under Article	: 19,
			Nos		_, filed with the demand,	
			Nos	1-11	_, filed with the letter of _	18 August 2000 (18.08.2000),
			Nos		_ , filed with the letter of _	
	X	the drawings,	sheets/fig	1/10-10/10	_, as originally filed,	
·			sheets/fig		_, filed with the demand,	
ļ			sheets/fig		_, filed with the letter of _	,
			sheets/fig		_, filed with the letter of _	·
2. The a	mendi	ments have result	ed in the cancel	lation of:		
		the description,	pages			
		the claims,	Nos			
		the drawings,	sheets/fig			
3.	This to go	report has been e beyond the discl	stablished as if osure as filed, a	(some of) the an is indicated in th	nendments had not been mad e Supplemental Box (Rule 7	de, since they have been considered 0.2(c)).
4. Addit	ional	observations, if n	ecessary:			
					•	



International application No.

PCT/DE99/01471

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

IV	IV. Lack of unity of invention				
1.	. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:				
	restricted the claims.				
		paid additional fees.			
		paid additional fees under protest.			
		neither restricted nor paid additional fees.			
2.		This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.			
3.	This	Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is			
	\boxtimes	complied with.			
		not complied with for the following reasons:			
ļ					
Ì					
ļ					
1	4. Cor in e	nsequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination establishing this report:			
		all parts.			
		the parts relating to claims Nos.			
1					

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/01471

I.	Racie	of the	report
1.	Dasis	OI LIIC	I CPOI

1.	. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets while	ch have been furnished to the receiving Office in response to an invitation
	under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" ar	nd are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

Sheets 1-15, containing sequence listings and submitted with the letter of 21 December 1999, do not form part of the application (PCT Rule 13ter.1(f)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/01471

NO

V.	Reasoned statement under Article 3stations and explanations supporting	5(2) with regard to nov g such statement	velty, inventive step or industrial applicat	pility;
1.	Statement			
	Novelty (N)	Claims	1-11	YES
		Claims		NO
	Inventive step (IS)	Claims	1-11	YES
	• • •	Claims		NO NO
	Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES

Claims

2. Citations and explanations

D1: S. SAU ET AL.: 'Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus*', JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 178, No. 7, April 1996 (1996-04), pages 2118-2126, XP000872772 US, mentioned in the application.

(with respect to Claims 3-9, see also Box VIII).

D1 describes that there are sequences derived from cap8 gene clusters which are preserved amongst many Staphylococcus aureus strains (see the abstract and the discussion). However, D1 does not indicate that the claimed oligonucleotides enable a specific and sensitive method of detecting Staphylococcus aureus.

The fact that cap8 sequences exist which yield results inferior to those of the claimed sequences (Example 26) lends additional support to the inventive step of the claims.

Therefore, it would not be obvious for a person skilled in the art to select exactly those sequences deriving from the cap8 gene as target sequences of a method for detecting all strains of *Staphylococcus aureus*.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 99/01471

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1) Claims 3-9 violate the requirements of PCT Art. 6 due to their lack of clarity.
The word "spacer" has no generally acknowledged meaning.

A definition is consequently essential. However, neither the claims nor the description provide such a definition. The examples do not mention a spacer either.



From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C.20231 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing (day/month/year) 25 January 2000 (25.01.00)	in its capacity as elected Office
International application No. PCT/DE99/01471	Applicant's or agent's file reference 51541BWOM1XXOO-P
International filing date (day/month/year) 10 May 1999 (10.05.99)	Priority date (day/month/year) 12 May 1998 (12.05.98)
Applicant	
GERBLING, Klaus-Peter et al	

1.	The designated Office is hereby notified of its election made:
	X in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
	10 December 1999 (10.12.99)
	in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2.	The election X was
۷.	was not
	made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

R. Forax

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

	From the INTERNATIONAL BUREAU			
PCT	To:			
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE (PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422) Date of mailing (day/month/year)	GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG Lützowplatz 11-13 D-10785 Berlin ALLEMAGNE			
07 December 1999 (07.12.99)				
Applicant's or agent's file reference 51541BWOM1XXOO-P	IMPORTANT NOTIFICATION			
International application No. PCT/DE99/01471	International filing date (day/month/year) 10 May 1999 (10.05.99)			
1. The following indications appeared on record concerning: the applicant the inventor	the agent the common representative			
Name and Address GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG	State of Nationality State of Residence			
Lützowplatz 11-13 D-10785 Berlin Germany	Telephone No. 030/264 13 30			
	Facsimile No. 030/264 18 38			
	Teleprinter No.			
The International Bureau hereby notifies the applicant that the the name the add the add the name.				
Name and Address	State of Nationality State of Residence			
	Telephone No.			
	Facsimile No.			
	Teleprinter No.			
3. Further observations, if necessary: An agent has now been appointed. The agent should be recorded as indicated above.				
4. A copy of this notification has been sent to:				
X the receiving Office X the International Searching Authority	X the designated Offices concerned the elected Offices concerned			
the International Preliminary Examining Authority	other:			
	Authorized officer			
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	S. Baharlou			
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	ephone No.: (41-22) 338.83.38			

	From the INTERNATIONAL BUREAU			
PCT	То:			
NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE (PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422) Date of mailing (day/month/year) 30 March 2000 (30.03.00)	GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG Schützenstrasse 15-17 D-10117 Berlin ALLEMAGNE			
Applicant's or agent's file reference				
51541BWOM1XXOO-P	IMPORTANT NOTIFICATION			
International application No. PCT/DE99/01471	International filing date (day/month/year) 10 May 1999 (10.05.99)			
The following indications appeared on record concerning: the applicant	the agent			
Name and Address GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG Lützowplatz 11-13 D-10785 Berlin	State of Nationality State of Residence Telephone No.			
Germany	030/264 13 30 Facsimile No.			
	030/264 18 38			
	Teleprinter No.			
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that to	ne following change has been recorded concerning:			
the person the name X the add				
Name and Address	State of Nationality State of Residence			
GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG Schützenstrasse 15-17	Telephone No.			
D-10117 Berlin Germany	030/264 13 30			
·	Facsimile No.			
	030/264 18 38			
	Teleprinter No.			
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to:				
X the receiving Office	the designated Offices concerned			
the International Searching Authority	X the elected Offices concerned			
X the International Preliminary Examining Authority	other:			
	Authorized officer			
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Simin Baharlou			
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38			

5690 2560

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM

GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 2 1 SEP 2000

WIPO

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

		(Altikei 30 und neg		')
Aktenzeichen P81399PC	des Anmelders oder Anwalts -Zie	WEITERES VORGEHEN	siehe Mittei vorläufigen	lung über die Übersendung des internationalen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationale	s Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum(7	ag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)
PCT/DE99/		10/05/1999	,	12/05/1998
		nationale Klassifikation und IPK		
C12Q1/68	Paterikiassinoatori (ii 11) odor	nadonalo radionimadori arra il vi		
Anmelder			,	
BIOINSIDE	GMBH et al.		· · ·	
1. Dieser i Behörde	nternationale vorläufige Prü e erstellt und wird dem Anm	ifungsbericht wurde von der m nelder gemäß Artikel 36 übermi	it der internati ittelt.	onale vorläufigen Prüfung beauftragte
2. Dieser l	BERICHT umfaßt insgesam	t 5 Blätter einschließlich diese	es Deckblatts.	
⊠ Aul und Bel	The state of the s			
3. Dieser	Bericht enthält Angaben zu	folgenden Punkten:		
	☐ Grundlage des Bericht	ls		
11	☐ Priorität			inhait and governlishe Anwandharkeit
111			ingerische i ai	igkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
IV	MangeInde Einheitlich		ah dar Naubai	t der orfinderische Tätigkeit und der
\ \ \ \	Begründete Feststellui gewerbliche Anwendb	ng nach Aftikei 35(2) hinsichtik arkeit; Unterlagen und Erkläru	ngen zur Stütz	t, der erfinderische Tätigkeit und der zung dieser Feststellung
VI	☐ Bestimmte angeführte	Unterlagen		
VII	☐ Bestimmte Mängel der	r internationalen Anmeldung		
VIII	■ Bestimmte Bemerkung	gen zur internationalen Anmelo	dung	
Datum der E	inreichung des Antrags	Datu	m der Fertigstel	lung dieses Berichts
10/12/1999				
	ostanschrift der mit der internat uftragten Behörde:	ionalen vorläufigen Bevo	ellmächtigter Be	diensteter Estate Allensteter
	Europäisches Patentamt D-80298 München		zatto, E	
<u> </u>	Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 52369 Fax: +49 89 2399 - 4465		Nr. +49 89 2399	8169
1	,	1 101.1	,	- · - · · · · · · · · · · · · · · · · ·

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/01471

I. Grundlage des Berichts

 Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.):

	nicht beigefügt, weil sie keine Anderungen entnalten. J.							
	Beschreibung, Seiten:							
	1-52		ursprüngliche Fassung					
	Pate	entansprüche, Nr.	:					
	1-11		eingegangen am	18/08/2000	mit Schreiben vom	18/08/2000		
	Zeic	hnungen, Blätter	:					
	1/10	-10/10	ursprüngliche Fassung					
2.	Aufg	grund der Änderun	gen sind folgende Unterlagen fo	ortgefallen:				
		Beschreibung,	Seiten:					
		Ansprüche,	Nr.:					
		Zeichnungen,	Blatt:					
3.		angegebenen Gri	ohne Berücksichtigung (von ein ünden nach Auffassung der Beh ssung hinausgehen (Regel 70.2	lörde über der	lerungen erstellt word n Offenbarungsgehalt	en, da diese aus den in der ursprünglich		
4.	Etw	aige zusātzliche B	demerkungen:					
IV	. Mai	ngelnde Einheitlic	chkeit der Erfindung					
1.		die Aufforderung : nelder:	zur Einschränkung der Ansprüch	he oder zur Za	ahlung zusätzlicher Ge	ebühren hat der		
	×	die Ansprüche ei	ngeschränkt.					
		zusätzliche Gebü	ihren entrichtet.					
		zusätzliche Gebü	ihren unter Widerspruch entrich	tet.				
		weder die Ansprü	üche eingeschränkt noch zusätz	liche Gebühre	en entrichtet.			

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER **PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/01471

2.		Die Behörde hat festgestellt, dat gemäß Regel 68.1 beschlossen zusätzlicher Gebühren aufzufor	, den A	Erfordemis de Inmelder nich	r Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat it zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung			
3.		Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordemis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13. und 13.3						
	×	erfüllt ist						
		aus folgenden Gründen nicht er	füllt ist:					
4.		ner wurde zur Erstellung dieses E rnationalen Anmeldung durchgef		eine internat	tionale vorläufige Prüfung für folgende Teile der			
	×	alle Teile.						
	☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.							
٧.	. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung							
1.	Fes	ststellung						
	Ne	uheit (N)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-11			
	Erfi	inderische Tätigkeit (ET)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-11			
	Ge	werbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Nein:	Ansprüche Ansprüche	1-11			
2	Un	terlagen und Erklärungen						

Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

1) Mit Schreiben vom 21.12.99 eingereichte Blätter 1-15 mit Sequenzprotokollen sind nicht Bestandteil der Anmeldung (Regel 13*ter*.1 f) PCT).

Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

- D1: S. SAU ET AL.: Cloning of type 8 capsule genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus' JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 178, Nr. 7, April 1996 (1996-04), Seiten 2118-2126, XP000872772 US in der Anmeldung erwähnt
- Ansprüche 1-11 entsprechen den Erfordernissen des Art. 33 PCT (bezüglich Ansprüche 3-9 siehe auch Punkt VIII hierunten).
 D1 beschreibt, dass es Sequenzen gibt, die vom cap8 Gencluster stammen, die unter vielen S. Aureus Stämmen konserviert sind (siehe Zusammenfassung und Diskussion). Jedoch weist D1 nicht darauf hin, dass die beanspruchten Oligonukleotide ein spezifisches und empfindliches Nachweisverfahren für S. Aureus erlauben. Die Tatsache, dass es cap8-Sequenze gibt, die wenig gute Ergebnisse erlauben, als die beanspruchten Sequenzen (Beispiel 26), stützt die erfinderische Tätigkeit der Ansprüche zusätzlich.

Es wäre deswegen für den Fachmann nicht naheliegend gewesen, genau diese aus cap8-Gen stammenden Sequenze auszuwählen, als Zielsequenzen eines Verfahrens zum Nachweis aller S. Aureus Stämme.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1) Ansprüche 3-9 verstossen gegen die Erfordernisse des Art. 6 PCT wegen

mangelnder Klarheit.

Das Wort "Spacer" hat keine allgemein anerkannte Bedeutung.

Eine Definition davon wäre deshalb unentbehrlich; die fehlt jedoch sowohl in den Ansprüchen als auch in der Beschreibung. Auch in den Beispielen wird kein Spacer erwähnt.

1

Europäisches Patentamt GD1 - Dienststelle Berlin 1 8. AUG. 2000

5

15

20

25

30

35

40

Patentansprüche

- 10 1. Testkit zum Nachweis für Staphylococus aureus als mikrobielle Verunreinigung nicht steriler Produkte, umfassend mindestens:
 - (a) einen Forward-Primer der SEQ. ID NO. 6,
 - (b) eine Sonde der SEQ. ID. NO. 7 und
 - (c) einen Reverse-Primer der SEQ. ID. NO. 8, wobei die Sequenzen auch Varianten umfassen, bei denen eine, zwei oder drei Nukleotide substituiert, deletiert und/oder insertiert sind und die Variante im wesentlichen dieselbe Funktion wie die jeweilige Sequenz hat, nämlich bei Sonden die Funktion der Bindung an DNA, bei Primern die Funktion der Bindung an DNA und die Bereitstellung eines verlängerbaren 3'-Endes für die DNA-Polymerase;

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den Sequenzen SEQ. ID NO 6, 7 und/oder 8 sind.

- Testkit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die mikrobielle Verunreinigung nach GMP-Richtlinien nachweisbar ist.
- 3. Testkit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass : die mikrobielle Verunreinigung in Arzneimitteln, Kosmetika und/oder Lebensmitteln nachweisbar ist.
- Testkit nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

20

25

30

35

2

5	dadı	ırch gek	ennzeich	met,	dass
	der	Testkit	Spacer	umfas	sst.

- 5. Testkit nach Anspruch 4,
 dadurch gekennzeichnet, dass
 der Spacer zwischen dem Forward-Primer und der Sonde
 positioniert ist.
- 15 6. Testkit nach Anspruch 4,
 dadurch gekennzeichnet, dass
 der Spacer zwischen der Sonde und dem Reverse-Primer
 positioniert ist.
- 7. Testkit nach Anspruch4, dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer upstream des Forward-Primers positioniert ist.
 - 8. Testkit nach Anspruch 4,
 dadurch gekennzeichnet, dass
 der Spacer downstream des Reverse-Primers positioniert
 ist.
 - Testkit nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Spacer 0 bis 40 Nucleotide umfasst.

- 5 10. Verfahren zur Detektion von Staphylococus aureus in Produkten, insbesondere Arzneimitteln oder Kosmetika, das die folgenden Schritte umfasst:
 - a) Einsetzen der SEQ.ID.NO. 6 als Forward-Primer, der SEQ.ID.NO. 8 als Reverse-Primer und der fluoreszenzmakierten Sonde SEQ.ID.NO. 7 oder deren Variationen; oder weiterhin all der Sequenzen, welche komplementar zu den Sequenzen SEQ.ID.NO. 6 bis 8 sind.
 - b) Vervielfältigen der DNA mit PCR; und
 - c) Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff anregen
 - d) Messung und Quantifizierung der Emission des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Herstellung der Sonden auf der TaqMan-Detektionstechnologie beruht.

10

VERTRACT PER DIE INTERNATIONALE ZU: MENARBEIT F DEM GEBIET DES PATENTW. ENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	WEITERES siehe Mitteilung über die Übermittlung d Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA		ormblatt PCT/ISA				
51541BW0M1XX00-P	VORGEHEN	zutreffend, nachsteher					
Internationales Aktenzeichen	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)		(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)				
PCT/DE 99/01471	10/05/19	999	12/0)5/1998			
Anmelder BIOINSIDE GMBH et al.							
Dieser internationale Recherchenbericht wurd Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Int Dieser internationale Recherchenbericht umfa	ernationalen Büro übern _	n Recherchenbehörde e nittelt. Blätter.	rstellt und wird den	n Anmelder gemäß			
X Darüber hinaus liegt ihm jew			Unterlagen zum S	tand der Technik bei.			
Grundlage des Berichts							
 a. Hinsichtlich der Sprache ist die inter durchgeführt worden, in der sie eing 	mationale Recherche au ereicht wurde, sofern un	f der Grundlage der inter ter diesem Punkt nichts	mationalen Anmelo anderes angegebe	dung in der Sprache n ist.			
Die internationale Recherch Anmeldung (Regel 23.1 b))	e ist auf der Grundlage e durchgeführt worden.	einer bei der Behörde ein	gereichten Überse	tzung der internationalen			
b. Hinsichtlich der in der internationale Recherche auf der Grundlage des S X in der internationalen Anmel	equenzprotokolis durchç	geführt worden, das	\minosāureseque	enz ist die internationale			
X zusammen mit der internation							
bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.							
bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.							
Die Erklärung, daß das nach internationalen Anmeldung i							
Die Erklärung, daß die in col wurde vorgelegt.	Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen,						
2. Bestimmte Ansprüche hab	en sich als nicht reche	rchierbar erwiesen (sie	he Feld I).				
3. X MangeInde Einheitlichkeit	der Erfindung (siehe Fe	eid II).					
Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfine	dung						
	gereichte Wortlaut genehmigt.						
wurde der Wortlaut von der I	Behörde wie folgt festges	setzt:					
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung							
wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt. wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.							
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr.							
wie vom Anmelder vorgesch	lagen		X	keine der Abb.			
weil der Anmelder selbst keir	ne Abbildung vorgeschla	gen hat.					
weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.							

nternationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01471

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:
Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)
Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:
siehe Zusatzblatt
Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. 1-3 (teilweise) (Erfindungen 1 und 6)
Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt. X Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

- 54

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-3 (TEILWEISE)

Verfahren und Kit zum Nachweis von S. aureus

2. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von P. aeruginosa

3. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von E. coli

4. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von Salmonella ssp.

5. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Vefahren und Kit zum Nachweis von Bakterien

6. Ansprüche: 1-3 (Teilweise)

Verfahren und Kit zum Nachweis von Enterobacteriaceae

INTERNATIONAL FR RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen PCT/DE 99/01471

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12Q1/68 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl., verwendete Suchbegriffe) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Kategorie* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anapruch Nr. X S. SAU ET AL.: "Cloning of type 8 capsule 1,2 genes and analysis of gene clusters for the production of different capsular polysaccharides in Staphylococcus aureus" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 178, Nr. 7, April 1996 (1996-04), Seiten 2118-2126, XP000872772 in der Anmeldung erwähnt Y abstract, discussion 3 X WO 90 15157 A (GENE TRAK SYSTEMS) 1-3 13. Dezember 1990 (1990-12-13) Seite 14, Zeile 1 -Seite 16, Zeile 16; Ansprüche -/--Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu Siehe Anhang Patentfamilie X "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen "A" Veröffentlichung, die den aligemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als beeonders bedeutsam anzusehen ist Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundellegenden Prinzipe oder der ihr zugrundellegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderlischer T\u00e4tigkeit beruhend betrachtet werden "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Datum des Abschlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 26. 04. UU 13. April 2000 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Luzzatto, E Fax: (+31-70) 340-3016

5

INTERNATIONAL FR RECHERCHENBERICHT

ternationalee Aktenzeichen
PCT/DE 99/01471

A CONTRACTOR OF THE CONTRACTOR	and Tall
egorie* Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komm	enden Teile Betr. Anspruch Nr.
LEE L G ET AL: "ALLELIC DISCRIMINATION BY NICK-TRANSLATION PCR WITH FLUOROGENIC PROBES" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 21, Nr. 16, 11. August 1993 (1993-08-11), Seiten 3761-3766, XP000470188 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument	3
WO 91 08305 A (U-GENE RESEARCH B.V.) 13. Juni 1991 (1991-06-13) das ganze Dokument	1-3
WO 92 02638 A (CETUS CORP) 20. Februar 1992 (1992-02-20) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche	1-3
WO 93 03186 A (HOFFMANN LA ROCHE) 18. Februar 1993 (1993-02-18) Seite 2, Zeile 7 -Seite 3, Zeile 10; Ansprüche; Beispiel 1	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

mation on patent family members

ernational Application No
PCT/DE 99/01471

					101/02	33/014/1
	atent document d in search repo	rt	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO	9015157	Α	13-12-1990	AT	127530 T	15-09-1995
				AU	5950690 A	07-01-1991
				CA	2031499 A	01-12-1990
				DE	69022180 D	12-10-1995
				DE	69022180 T	01-02-1996
				EP	0431149 A	12-06-1991
				JP	4500315 T	23-01-1992
				US	5401631 A	28-03-1995
WO	9108305	A	13-06-1991	NL	8902926 A	17-06-1991
				NL	9002157 A	17-06-1991
				AU	6950791 A	26-06-1991
WO	9202638	A	20-02-1992	US	5210015 A	11-05-1993
				AU	666837 B	29-02-1996
				AU	8651091 A	02-03-1992
				CA	2088683 A	07-02-1992
				EP	0543942 A	02-06-1993
				EP	0919565 A	02-06-1999
				JP	2825976 B	18-11-1998
				JP	6500021 T	06-01-1994
				US	5804375 A	08-09-1998
				US	5487972 A	30-01-1996
WO	9303186	A	18-02-1993	AT	172500 T	15-11-1998
				AU	679671 B	10-07-1997
				AU	2420292 A	02-03-1993
				CA	2116543 A	18-02-1993
				DE	69227379 D	26-11-1998
				DE	69227379 T	10-06-1999
				EP ES	0613502 A	07-09-1994
				NZ NZ	2125268 T	01-03-1999
				US	243802 A 5620847 A	22-12-1994
				US	302064/ A	15-04-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Integnationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:
C12Q 1/68

A2
(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/58713
(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Mai 1999 (10.05.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 22 108.8

12. Mai 1998 (12.05.98)

DE

PCT/DE99/01471

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BIOIN-SIDE GMBH [DE/DE]; Warthestr. 21, D-14513 Teltow (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERBLING, Klaus-Peter [DE/DE]; Peschkestrasse 3, D-12161 Berlin (DE). LAUTER, Frank-Roman [DE/DE]; Ritterstrasse 25A, D-14513 Teltow (DE). GROHMANN, Lutz [DE/DE]; Stubenrauchstrasse 21, D-12161 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS IN PRODUCTS
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON MIKROORGANISMEN IN PRODUKTEN
- (57) Abstract

The invention relates to a detection method and a test kit for economic detection of germs in pharmaceutical and cosmetic products. The invention uses specific probes and primers whose replication is made visible by means of a special indicator system, whereby a fluorescent colorant is released.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Detektionsverfahren und ein Testkit zur schnellen, ökonomischen Detektion von Keimen in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten. Dabei werden spezifische Sonden und Primer eingesetzt, deren Replikation durch ein spezielles Indikatorsystem sichtbar gemacht wird, wobei ein Fluoreszenz-Farbstoff freigesetzt wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑÜ	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
ΑZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	-	Togo
BE	Belgien	GN	Guinea	MK		TJ	Tadschikistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TR	Türkei
ВJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	UG	Uganda
CA	Kanada	ľT	Italien	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE			Amerika
CG	Kongo	KE	Kenia	NL.	Niger	UZ	Usbekistan
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Niederlande	VN	Vietnam
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik		Norwegen	YU	Jugosławien
CM	Kamerun		Korea	NZ PL	Neusceland	zw	Zimbabwe
CN	China	KR	Republik Korea		Polen		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	PT	Portugal		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RO	Rumānien		
DE	Deutschland	Li	Liechtenstein	RU	Russische Föderation		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SD	Sudan		
EE	Estland	LR	Liberia	SE	Schweden		
		LR	LIDCIIA	SG	Singapur		

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

1

Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten

Die Erfindung umfaßt Verfahren zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht - steriler Produkte, bevorzugt nach GMP - Richtlinien. Weiterhin umfaßt die Erfindung einen Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen und die Verwendung von Primersequenzen und Sondensequenzen zur Bestimmung von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere in Arzneimitteln und Kosmetika einschließlich ihrer Ausgangsstoffe und Zwischenprodukte.

- Das Verfahren dient zur quantitativen Identifizierung von Mikroorganismen durch Detektion spezifisch amplifizierter DNA-Sequenzen und soll als Ersatz entsprechender Methoden in der Europäischen Pharmakopöe, Abschnitt 2.6.12-13,1997 (EP) sowie weiteren nationalen Monographien wie zum Beispiel USP eingesetzt werden.
- Die Herstellung von Arzneimitteln und Kosmetika nach GMP Richtlinien beinhaltet chemische, physikalische und biologische Prüfungen zur Sicherstellung der Qualität. Bei Kosmetika muß der Hersteller dafür sorgen, daß von den Fertigprodukten keine Gesundheitsgefährdung ausgeht (EG Kosmetikverordnung, 76, 768 EWG (KOSVO), 6). Änderungsrichtlinie der EG KOSVO 93/35/EEC, 1993 und Forderungen des nationalen Rechts in Deutschland (LMBG § 24).
 - Bei Arzneimitteln sind die mikrobiologischen Reinheitsanforderungen wesentlich präziser und decken die Anforderungen der KOSVO mit ab (EP Abschnitt 2.6.12-13,1997).

Die Anforderungen beinhalten zwei Gruppen:

- 25 (i) Die Z\u00e4hlung der gesamten lebensf\u00e4higen aeroben Bakterien und Pilze (Gruppe Gesamtkeimzahl) sowie
 - (ii) Den Abwesenheitsnachweis bestimmter Mikroorganismen: Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Streptococcus faecalis, Salmonellen und Enterobactriaceae (Gruppe Leitkeime).

30

5

Stand der Technik

Keimzahlbestimmung mit Nährmedien

Als Methoden zur Zählung der gesamten lebensfähigen aeroben Bakterien (Gruppe Gesamtkeimzahl) werden in der EP konventionelle mikrobiologische Techniken beschrieben, die das Wachstum der nachzuweisenden Mikroorganismen in bestimmten

Flüssignährmedien oder auf Agarplatten beinhalten. Im Handel sind zahlreiche entsprechende Fertigprodukte oder deren Ausgangsstoffe erhältlich.

Die Anwendung der in der EP beschriebenen Methoden zur Bestimmung der aeroben Keime (Gruppe Gesamtkeimzahl) hat folgende Nachteile:

- Die Effizienz ist niedrig, da hoher Zeitbedarf bis zum Ergebniserhalt (3-5 Tage) 5 besteht.
 - Die Ergebnisse sind unpräzise. Die Akzeptanzgrenzen dürfen um den Faktor 5 schwanken, EP, Abschnitt 2.6.12
 - Die Testmethoden sind schlecht und nur im geringen Maße automatisierbar.
- 10 Bedingt durch die Nährmedieneigenschaften können nur gut wachsende Mikroorganismen, nicht aber, wie gefordert, alle aeroben Mikroorganismen nachgewiesen werden.
 - Die Lagerhaltungskosten sind für Medien und Brutschränke hoch.
- Bei Arzneimitteln mit bakteriostatischen Eigenschaften führt die Anwendung der 15 EP - Methoden aufgrund der geringen Wiederfindung zugesetzter Testmikroorganismen teilweise zu nicht verwertbaren Ergebnissen.
 - Umfangreiche Plastikabfälle fallen an.

25

- Die Energiekosten für Medienherstellung und Autoklavieren der anfallenden Abfälle sind hoch.
- 20 Die Fertilitätsprüfung aller Medienchargen ist sehr aufwendig insbesondere wegen kurzer Haltbarkeiten von Fertigmedien.
 - Alternative Methoden zur Gesamtkeimzahlbestimmung im Handel sind: Geräte, die mittels Laserscan arbeiten wie z.B. CHEMSCAN (Chemunex):
 - Diese Methode ist ungeeignet zum Nachweis von Mikroorganismen, die wie die Bakteriengattung Sarcina keine Einzelkolonien bilden.
 - Außerdem eignet sich diese Methode nicht für feste und ölige Prüfprodukte.

Nachweis spezieller Mikroorganismen durch unterschiedliche Kultureigenschaften und spezielle Stoffwechselprodukte

- 30 Als Methoden zur Bestimmung spezieller Keime (Gruppe Leitkeime) werden in der EP mikrobiologische Techniken beschrieben, die zur Grobdifferenzierung das Wachstum der jeweiligen Mikroorganismen in bestimmten selektiven Nährmedien oder auf Agarplatten beinhalten. Anschließend werden zur
- Feindifferenzierung spezifische Stoffwechselreaktionen der jeweiligen Mikroorganismen 35 wurde genutzt. Entsprechende Nachweissysteme, wie z.B. APILAB oder VITEK, sind weit verbreitet.
 - Die Anwendung der in der EP beschriebenen Methoden zur Bestimmung der speziellen Keime (Gruppe Leitkeime) hat die gleichen Nachteile, wie für die Anwendung der EP -

geforderten Methoden zur Bestimmung der aeroben Keime (siehe oben). Ein zusätzlicher Nachteil ist, daß die Selektivität der Nachweismethoden auf Stoffwechselunterschiede beschränkt ist und damit nur unzureichende Differenzierungen zuläßt.

5

10

20

25

30

35

Nachweis spezieller Mikroorganismen durch ATP- Gehaltsbestimmung nach Vorkultivierung

Alternative Methoden im Markt sind: Mikrobiologische Schnelltests, beruhend auf einem Vitalnachweis durch ATP - Bestimmung (z.B. Firma Millipore) nach Vermehrung der Mikroorganismen in Nährmedien.

Nachteil: Speziesbestimmungen sind nicht möglich und die Meßergebnisse unterliegen hohen Schwankungen in Abhängigkeit des Vitalitätszustands und sind für unterschiedliche Bakteriengattungen sehr verschieden.

Nachweis spezieller Mikroorganismen nach Vorkultivierung mittels DNA-Sonden, Primern und PCR

Weitere alternative Methoden im Handel sind unterschiedliche PCR - Applikationen, die aber, wie z.B. bei Chen et al. 1997, J.. Food Microbiol. 35, 239-250 auf die Prüfung von Lebensmitteln ausgerichtet sind und eventuell nicht die strengen GMP - Anforderungen an die Qualitätsprüfung von Arzneimitteln erfüllen.

- Die vorhandenen PCR Applikationen sind in der Regel anfällig für Kontaminationen durch PCR - Produkte, sind wenig reproduzierbar und schwer quantifizierbar. Darüber hinaus sind sie zeitaufwendig, da bei den alternativen PCR - Verfahren in der Regel mehrere Hybridisierungsschritte zur Detektion des PCR - Produktes notwendig sind.
- Diese Technologien sind in der Regel außerdem nur begrenzt automatisierbar und störanfällig, da in der Regel zu mehreren Zeitpunkten der Applikation verschiedene Reagenzien zugegeben werden müssen.

Bei dem Verfahren gemäß der Patente US 4,800,159 und US 4,683,195 wird die zu amplifizierende Nukleinsäure, die einzelsträngig vorliegt oder einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotidprimer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurenstrang komplementäres Verlängerungsprodukt des betreffenden Primers synthetisiert wird und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrize zur Synthese eines Verlängerungsproduktes des anderen Primers dienen kann. Nach Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, können

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

4

die gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern verwendet werden. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungspositionen der Primer liegt.

5

10

15

20

25

35

Quantitativer Nachweis von Mikroorganismen - DNA durch eine spezielle Fluoreszenz - PCR - Technologie

Eine verfeinerte Methode ist das Verfahren gemäß Patent US 5,210,015 von Gelfand et al. Dabei wird eine Oligonukleotid-Sondenkonstruktion verwendet, die mit einem Teil des Nukleinsäurestrangs der Matrize hybridisiert, wobei die Oligonukleotidsonde so ausgewählt wird, daß sie zwischen die Primerpaare (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) für die Amplifikation der diagnostischen Zielsequenz des jeweiligen Mikroorganismus paßt. Die Sondenkonstruktion und Synthese basiert auf der TaqMan - Technologie (Holland et al. 1993 und Lee et al. 1993, Nucl. Acids. Res, Vol 21, p 3761 - 3766).

Chemische Grundlage dieser neuen Methode ist der 1991 erstmalig publizierte 5'-Nuklease PCR - Assay (Holland et al. 1991, PNAS USA 88: 7276). Kernstück dieser Methode ist die 5'-Nuklease-Aktivität der TaqPolymerase und der Einsatz von fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Gensonden. Diese Gensonden sind am 5'-Ende mit einem Fluoreszein - Derivat (Reporter) und am 3'-Ende mit einem Rhodaminderivat (Quencher) markiert. Durch die räumliche Nähe beider Farbstoffe wird die Fluoreszenzstrahlung des Reporters von dem Quencherfarbstoff absorbiert. Während der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden Reporter und Quencher durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq - Polymerase räumlich voneinander getrennt. Die Fluoreszenzstrahlung des Reporters wird nicht mehr gequencht und kann direkt gemessen und quantifiziert werden. Je mehr Sonden gespalten werden, desto höher ist die Fluoreszenz - Emission der Reportermoleküle. Die Menge an freigesetzter Emission ist der Menge der entstehenden PCR Produkte proportional und diese ist wiederum der Kopienzahl der in der PCR eingesetzten Gene proportional. Über die Genkopienzahl läßt sich die in der Analysenprobe vorhandene Organismenzahl berechnen. Die Methode ist extrem sensitiv, da während der PCR Reaktion eine Genvermehrung und somit eine Signalamplifikation stattfindet. Da verschiedene Reporterfarbstoffe am Markt zur Verfügung stehen, können interne Kontrollen und Standards bei jeder Reaktion mitgeführt werden. Darüber hinaus kann eine Probe auf das Vorhandensein mehrerer Gene/Organismen gleichzeitig untersucht werden. Zur Zeit stehen im Handel drei verschiedene Reporterfarbstoffe zur Verfügung.

10

15

20

Aufgabe und Lösung

Aufgabenschwerpunkt der vorliegenden Erfindung bildet die Entwicklung von Nachweisverfahren für Mikroorganismen, die erfahrungsgemäß häufig als Produktkontaminanten auftreten. Das sind insbesondere in Bezug auf die Gruppe der Leitkeime: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Salmonellen Arten, in Bezug auf die Gruppe Gesamtkeimzahl: die Bakterien und die Enterobacteriaceae.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Reagenzien, Verfahren und die Verwendung von Substanzen, die den Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht - steriler Produkte zum Beispiel entsprechend Anforderungen der EP einfacher, präziser und effizienter gestalten. Dabei sollen weniger Komponenten als zum Beispiel entsprechend Anforderungen der EP enthalten sein. Eine weitere Aufgabe ist es, sehr sensitive und quantitative Nachweise für die geforderten Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Testkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht steriler Produkte, insbesondere nach GMP - Richtlinien, auch Kosmetika und Lebensmittel, umfassend mindestens ein DNA-Fragment, das die folgenden SEQ ID und Spacer (Abstandhalter) umfaßt:

- (a) einen Forward-Primer (SEQ ID Forward-Primer):
- (b) eine Sonde (SEQ ID Sonde);
- (c) einen Reverse-Primer (SEQ ID Reverse-Primer);
- (d) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Forward-Primer und Sonde,
- 25 (e) gegebenenfalls einen Spacer zwischen Sonde und Reverse-Primer,
 - (f) gegebenenfalls einen Spacer upstream des Forward-Primers
 - (g) gegebenenfalls einen Spacer downstream des Reverse-Primers

- wobei die SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)] auch Varianten umfassen, bei denen eine, zwei oder drei Nukleotide substituiert, deletiert und / oder insertiert sind.

dabei hat die Variante im wesentlichen dieselbe Funktion wie die Sequenz der SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)].

bei Sonden die Funktion der Bindung an DNA und bei Primern die Funktion der Bindung an DNA und die Bereitstellung eines verlängerbaren 3' Endes für die DNA -Polymerase;

30

35

wobei die Spacer 0-40 Nukleotiden umfassen,

das DNA-Fragment genommen aus der Gruppe

- (i) für Staphylococcus aureus
- 5 SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer

- (ii) für Pseudomonas aeruginosa
 - SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
- 10 SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

- (iii) für Escherichia coli
 - SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und

- 15 SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer
 - (iv) für Salmonella ssp.

SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer

- 20 (v) für Bakterien
 - SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer

- (vi) für Enterobacteriaceae
- 25 SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer

(vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)

SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer

30 SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

Vorteilhaft ist eine Kombination aus zwei mehr bevorzugt aus drei noch mehr bevorzugt aus vier und am meisten bevorzugt aus fünf, sechs oder sieben Gesamtsequenzen.

Bevorzugt ist ein Kit mit PCR Reagenzien.

Mehr bevorzugt ist ein Kit mit PCR Reagenzien und TaqMan.

Alle genannten Sequenzen sind in dem Beispiel 24 aufgeführt. Für eine erfolgreiche TaqMan - PCR werden an die Primer- und Sondensequenzen (Beispiel 24) folgende Anforderungen gestellt:

5

- Primer sollten zwischen 15-30 Basen lang sein.
- Sondensequenz muß sich zwischen Primer Sequenzen auf der zu amplifizierende DNS befinden.
- Sonde sollte zwischen gegebenenfalls 18-30 Basen lang sein.
- Sonde sollte einen GC Gehalt von 40 60% besitzen.
 - Der Tm der Sonde (Schmelzpunkt) sollte um 5 10 C° über dem Tm der Primer liegen
 - Am 5' Ende der Sonde sollte sich kein G befinden.
- In der Sondensequenz sollte nie mehr als 3 mal dieselbe Base hintereinander folgen.
 - Keine Komplementarität zwischen Sonde und Primern oder innerhalb der Primer und keine auffälligen Sekundärstrukturen innerhalb der Sonde und der Primer.

Trotz dieser allgemeinen Richtlinien für das Design von Primern und Sonden (Livak et 20 al. 1995, Guidelines for designing Taqman fluorogenic probes for the 5' Nuclease assays, Perkin Elmer Research News) muß die optimale Primer- und Sondenkombination für jede TaqMan - PCR - Anwendung neu experimentell bestimmt werden. Es konnte in einer Reihe von Beispielen (Beispiel 25) gezeigt werden, daß obwohl oben genannten Richtlinien eingehalten wurden, kein optimales TaqMan PCR 25 System entwickelt werden konnte. Auf der anderen Seite ist man durch die Sequenzcharakteristika der diagnostischen Zielsequenz des jeweiligen Organismus (z.B. hoher GC Gehalt, stark repetitive Sequenzen oder konservierte Sequenzbereiche) ggf. gezwungen, Primer- und Sondensequenzen auszuwählen, die nicht den oben genannten Designrichtlinien entsprechen. Konsequenz dieser Einschränkungen zu den 30 Richtlinien ist, daß zum Erreichen der notwendigen Spezifität und Sensitivität eines TaqMan - PCR - Tests die Auswahl der diagnostischen Zielsequenz aus dem Genom des zu detektierenden Mikroorganismus und die experimentelle Determinierung der optimalen Primer- und Sondensequenzen essentiell ist.

35

d.PCR - Reaktionsbedingungen einschließlich TaqMan Puffer:

Die Spezifität und Sensitivität eines TaqMan - PCR Tests wird neben den Primer- und Sondensequenzen (a - c) durch folgende Parameter bestimmt:

15

20

25

- (i) Höhe der Denaturierungstemperatur in den ersten PCR Zyklen
- (ii) Höhe der Annealingtemperatur während der Amplifikationsphase der PCR
- (iii) Anzahl der PCR Zyklen
- 5 (iv) Einsatz von PCR Additiven wie Glyzerin und / oder Formamid
 - (v) Einsatz von 7-Deaza-2-deoxy-GTP neben GTP bei Genen mit hohem G/C Gehalt
 - (vi) Höhe der Mg++- Ionen Konzentration im PCR Puffer
 - (vii) Konzentration der Primer und Sonde
- 10 (viii) Menge an Taq DNA Polymerase
 - (ix) Abstand des cis orientierten Primers zur Sonde

Alle diese Parameter wurden bei der Entwicklung hier aufgeführten TaqMan - PCR Tests experimentell berücksichtigt (Daten nicht gezeigt).

Beschreibung der Nukleinsäuren, die als diagnostische Zielsequenzen eingesetzt werden:

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des Amplifikationsverfahren und Nachweisverfahrens für die oben genannten Zielorganismen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäure- Sequenzen enthalten unter anderem auch die Gene bzw. Genfragmente, die für eine bestimmte Mikroorganismenart, -gattung, -familie oder -abteilung charakteristisch sind. Die Nukleinsäuresequenzen können in einen PCR - Test als diagnostische Zielsequenzen für einen spezifischen Nachweis dieser Art, Gattung, Familie oder Abteilung eingesetzt werden.

Für den Nachweis der oben genannten Zielorganismen wurden folgende Zielsequenzen ausgewählt:

	Organismus/nen	Genbezeichnung
30		_
	(i) Staphylococcus a	
	(ii) Pseudomonas ae	eruginosa alg Q
	(iii) Escherichia coli	mur A
	(iv) Salmonella ssp.	inv A
35	(v) Bakterien	16S r RNA

Die Gene, aus denen die diagnostischen Zielsequenzen ausgewählt wurden, werden in den Beispielen detailliert beschrieben.

10

20

25

30

35

Definitionen:

Primerdefinition (inklusive deren Variationen): Unter einem Primer wird ein Molekül verstanden, das an einem polymeren Grundgerüst eine Anzahl von Nukleotiden aufweist. Die Sequenz der Nukleobasen wird so gewählt, daß sie zu aufeinanderfolgenden Basen der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz zu mehr als 80% komplementär sind. Dieses Molekül besitzt jeweils mindestens ein verlängerbares Ende. Unter Verlängerung wird insbesondere die enzymkatalysierte Ankopplung von Baseneinheiten unter Verwendung von Mononukleosid - Triphosphat - Einheiten oder Oligonukleotiden verstanden. Als Enzym wird bevorzugt eine DNA - Polymerase eingesetzt. Die Nukleinsäure, die Nukleotidsequenzen enthält, welche amplifiziert werden sollen, dient hierbei als Matrize für den spezifischen Einbau von Basen. Die Sequenz der Matrize bestimmt die Sequenz der an den Primer angehängten Basen. Als Primer werden Moleküle mit 15-30 Basen verwendet. Als verlängerbares Ende dient im Falle einer DNA - Polymerase bevorzugt das 3'-Ende. Besonders bevorzugt sind Primer, die vollständig homolog zu einer Teilsequenz der Zielnukleotidsequenzen SEQ. ID. NO.1-5 sind (Beispiel 24).

Sondendefinition (inklusive Variationen): Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, das wie die Primer an einem polymeren Grundgerüst eine Anzahl von Nukleotiden aufweist. Dabei wird ein Sondenkonstruktionsverfahren gemäß Patent US 5,210,015, verwendet, das bereits oben beschrieben wurde. Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind 18-30 Nukleobasen lang. Spezifische Sequenzen erhält man durch Aussuchen einer mindestens 18 Basen langen Sequenz aus den jeweiligen Matritzen (SEQ. ID. NO. 1-5, Beispiel 24). Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der jeweiligen Matritzen (SEQ. ID. NO. 1-5) sind. Besonders bevorzugt sind Sonden mit strenger Homologie.

Definition von Homologie: Gegenstand der Erfindung sind Nukleotidsequenzen, die zu mindestens 80%, bevorzugt zu 90 %, am meisten bevorzugt zu 95% komplementär sind zu den Ziel-Nukleotidsequenzen SEQ. ID. NO. 1 bis 5 und 46 und 48.

Die Homologie (in %) ergibt sich aus der Anzahl an identischen Purin- bzw. Pyrimidinbasen in einer gegebenen Nukleotidsequenz.

Definition von Hybridisieren: Hybridisieren liegt dann vor, wenn die folgenden Verfahrensschritte vorliegen, bevorzugt die folgenden Bedingungen.

Die erfindungsgemäßen Primer und Sonden binden an komplementäre Basen bevorzugt an komplementäre Nukleotidsequenzen im Erbgut der Zielorganismen aus

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

der Gruppe Gesamtkeimzahl und an komplementäre Nukleotidsequenzen im Erbgut der Zielorganismen aus der Gruppe Leitkeime.

10

Darüber hinaus binden sie bevorzugt nicht an Nukleinsäure - Sequenzen, die für andere Mikroorganismen spezifisch sind.

5

25

30

35

Definition von Arzneimittel: Diese Substanzen sind die in den Monographien der EP beschriebenen Wirkstoffe, Rohstoffe, Hilfsstoffe, und Zubereitungen, die zur Anwendung in der Humanmedizin und Veterinärmedizin bestimmt sind.

Definition von Kosmetika: Diese Substanzen sind nicht in den Monographien der Pharmakapöen beschrieben, sondern unterliegen den Richtlinien der KOSVO und des LMBG. Sie umfassen Rohstoffe, Hilfsstoffe und Zubereitungen, die zur Anwendung an Menschen und Tieren bestimmt sind.

Definition von Mikroorganismus: Dieser Begriff umfaßt in erster Linie Organismen, die im menschlichen und tierischen Körper Krankheiten hervorrufen können und nur mikroskopisch wahrnehmbar sind. Sie sind in der Regel einzellig bzw. treten in lockeren Verbänden gleichartiger Zellen auf und werden aufgrund ihrer einfachen zellulären Organisation als Protisten bezeichnet. Ihre morphologischen und kulturell-biochemischen Merkmale, sowie ihre chemische Zusammensetzung, Antigen - Eigenschaften und genetischen Merkmale sind in der Literatur gut dokumentiert, z.B. in: Mikrobiologische Diagnostik, Burkhardt, 1992.

Definition von PCR-Reagenzien: PCR-Reagenzien sind Stoffe, die für eine PCR Reaktion mit maximaler Sensitivität und Spezifität notwendig sind, insbesondere DNA-Polymerase, Mg²⁺ Ionen wie z. B. MgCl₂, Kaliumsalze wie z.B. KCI, Additive wie z.B. Glycerin oder DMSO oder Formamid, Primer und Sonden, Desoxynukleotide, Puffersubstanz wie z. B. Tris-Base sowie optionale Zusätze in Form von passiven Fluoreszenzreferenz-Verbindungen wie z.B. das Fluoreszenzfarbstoff-Derivat ROX und z. B. 7-Deaza-2-deoxy-GTP als Ersatz von dGTP.

Definition von Komplementär: Komplementäre Strukturen entsprechen sich gegenseitig oder ergänzen sich. So sind zum Beispiel die Polynucleotid – Stränge der natürlichen DNA – Doppelhelix komplementär. Sie bilden zwei komplementäre Stränge aufgrund der spezifischen Basen – Paarung (A-T beziehungsweise G-C). Dadurch ist die Nucleotid – Sequenz im anderen Strang eindeutig festgelegt, zwar nicht identisch, aber komplementär. Ähnliches gilt für DNA – RNA – Hybride (mit A-U anstelle von A – T – Paaren). cDNA hat eine zu einer mRNA komplementäre Struktur. Bevorzugt ist eine

komplementäre Struktur, bei der (aa) die Sequenz des Forward-Primer und die Sequenz der Sonde oder (bb) die Sequenz der Sonde und des Reverse-Primers einer zuvor genannten Gruppe (i) bis (vii) alle beide komplementär zu den definierten Sequenzen sind. Mehr bevorzugt ist eine komplementäre Struktur, bei der die Sequenz des Forward-Primer, die Sequenz der Sonde und des Reverse-Primers einer zuvor genannten Gruppe (i) bis (vii) alle drei komplementär zu den definierten Sequenzen sind.

Verfahren

- Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere Arzneimitteln oder Kosmetika, welches Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
 - a) Einsetzen von Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden mit den entsprechenden Sequenzen und deren Variationen,
- 15 (i) für Staphylococus aureus
 - SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
 - SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
 - SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer
 - (ii) für Pseudomonas aeruginosa
- 20 SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
 - SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
 - SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer
 - (iii) für Escherichia coli
 - SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer
- 25 SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und
 - SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer
 - (iv) für Salmonella ssp.
 - SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer
 - SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und
- 30 SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer
 - (v) für Bakterien
 - SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer
 - SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
 - SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer
- 35 (vi) für Enterobacteriaceae
 - SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer
 - SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und
 - SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer

20

(vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)

SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

- oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind,
 - b) Vervielfältigen der DNA mit PCR; und
 - Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff anregen,
- 10 d) Messung und Quantifizierung der Emission des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes.

Die Erfindung umfaßt ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Herstellung der Sonden auf der TaqMan-Detektionstechnologie beruht.

Kern der Erfindung

Kern der Erfindung ist die Kombination bestimmter ausgewählter Sonden/Primer-Paare, die Mikroorganismen zufriedenstellend detektieren können. Die Optimierung der Sonden/Primer-Paare und der PCR Reaktionsbedingungen auf Sensitivität und Eignung zur GMP-konformen Produktprüfung nach EP, 2.6.12-13: Microbial contamination of products not required to comply with the test for sterility (1997) ist ebenfalls wesentlich. Dabei wird eine PCR-Technologie nach den US-Patenten US 4,800,159 und US 4,683,195 verwendet. Dabei findet insbesondere die TaqMan-Technologie Anwendung, die in dem US-Patent 5,210,015 beschrieben ist, welches am 11. Mai 1993 als Patent herausgegeben worden ist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren oder dem erfindungsgemäßen Testkit handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der Fluoreszenz-PCR Technologie (TaqMan) für die oben genannten Zielmikroorganismen.

30 Vorteile:

Die erfindungsgemäßen Verfahren und die Testkits sind denen in der EP vorgeschriebenen Analysenmethoden in vielen Punkten weit überlegen (für Kosmetika wird z. Zt. noch keine vorgeschriebene Methode gefordert) und sollen diese, nach Validierung des Verfahrens mit dem jeweiligen Prüfprodukt, vollständig ersetzen. Die Möglichkeit, andere Analysenmethoden zu benutzen, wird in der EP (General Notices) explizit zugelassen, wenn sie die gleichen Ergebnisse wie die vorgeschriebenen Methoden ergeben.

30

Insbesondere hat das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Vorteile:

- (A) Kit und Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen der Gruppe Gesamtkeimzahl :
- Erstmals können durch Anwendung dieses Kits und Verfahrens ohne vorhergehende Kultivierung alle kontaminierenden Bakterien, deren Sequenz in der NIH Datenbase, USA, Stand 11.1997, beschrieben sind, analytisch bestimmt werden. Dabei werden lebende und nicht-vermehrungsfähige Bakterien quantitativ und sehr präzise mit einer Sensitivität von 1-3 Bakterien im Prüfprodukt erfaßt. Konsequenz der Anwendung ist eine deutliche erhöhte Produktsicherheit für den Verbraucher, da:
 - Sporen und schwer kultivierbare Mikroorganismen, von denen eine Gesundheitsgefährdung ausgehen kann, erfaßt werden können,
 - Nicht-vermehrungsfähige Mikroorganismen, die schwer nachweisbare Toxine enthalten, ebenfalls erfaßt werden können,
- Kontaminierende DNA bakterieller Herkunft, deren Abwesenheit zur Zeit schon in Biologicals und Produkten aus der rDNA-Technologie gezeigt werden muß, (EP,1997 und USP 1995) in allen Prüfprodukten einfach und effizient nachgewiesen werden kann.

Außerdem gibt es für die Anwendung keine besonderen Sicherheitsauflagen, da keine Komponenten des Kits einer Gefahrstoffverordnung unterliegen.

- (B) Alle beanspruchten Kits und Verfahren:
- Die Anwendung hat ökonomische Vorteile für Verbraucher und Hersteller, da die bisherigen Verfahren um mehrere Tage zeitaufwendiger sind und häufig den zeitbestimmenden Schritt in der Freigabeanalytik darstellen. Schnelle Ergebnisse zur mikrobiologischen Sicherheit eines biologisch anfälligen Prüfprodukts führen zur Senkung der Kosten in Entwicklung und Produktion wie z.B. niedrigere Lagerhaltungskosten oder schnellerer Response auf variable Marktanfragen und damit insgesamt zur Senkung der Gestehungskosten, die in preiswertere Produkte einmünden.
- Die Anwendung hat ökologische Vorteile, da die Reduktion von Analysenzeit und Analysenmaterial (Plastik und Medien) die erheblichen Energiekosten deutlich erniedrigt.

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

14

Beispiele:

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben die entwickelten PCR-Schnelltests zur Detektion der Zielmikroorganismen, inklusive aller Sequenzvariationen und Targetsequenzen:

,			
	(i)	Staphylococus aureus	(Beispiele 1-5)
	(ii)	Pseudomonas aeruginosa	(Beispiele 6-9)
	(iii)	Escherichia coli	(Beispiele 10-13)
	(iv)	Salmonella ssp.	(Beispiele 14-17)
10	(iv)	Bakterien	(Beispiele 18-23)
	(vi)	Target-Sonden-und Primersequenzen	(Beispiel 24)
	(vii)	Sequenzvariationen	(Beispiel 25)
	(viii)	(Entwicklungssequenzen Sonden und Primer mit	, , ,
	. ,	nicht zufriedenstellender Testspezifität/Sensitivität	(Beispiel 26)

15

20

40

Beispiel 1

DNA-Freisetzung nach Voranreicherung

Je 100 µl-Aliquote der jeweiligen Mikroorganismen-Kultur wurde zur Freisetzung der DNS lysiert (Makino et al. Applied Environ. Microbiol. 3745-3747,1995). Die DNS wurde von Proteinen und sonstigen PCR-Inbibitoren gereinigt und dann in PCR Amplifikationsexperimenten eingesetzt.

Beispiel 2

Nachweis von Staphylococcus aureus

Der Nachweis von S. aureus erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von cap-8 Gensequenzen (SEQ. ID. NO. 1, siehe Beispiel 24). Das cap-8 Gencluster verschlüsselt Proteine, die bei der Biosynthese der Kapsel von S. aureus beteiligt sind. Die Kapsel umhüllt die Oberfläche dieser Bakterien und stellt einen Schutzmechanismus gegen die Abwehrmechanismen der Wirtsorganismen dar. Die molekulare Zusammensetzung der Kapsel ist für S. aureus spezifisch und stellt sozusagen einen molekularen Fingerabdruck dieser Staphylococcen-Art dar. Der (open reading frame O) ORF-O des cap-8 Genclusters ist in den verschiedenen Serotypen von S. aureus konserviert (Sau und Lee 1996, J. Bacteriol. 178, 2118-2126). Die DNA-Sequenzen aus dem ORF-O des cap-8 Genclusters (SEQ. ID. NO. 1) wurden als diagnostische DNA-Sequenzen zur Synthese von artspezifischen DNA-Primern und Sonden ausgewählt.

Als Resultat von DNA-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende cap-8 spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

1. PCR-Sonde

20 mer 5'-TAMRA- CCT GGT CCA GGA GTA GGC GG 3' - FAM

(Sonde cap-8 # 15460*, als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 7] Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

10

30

2. PCR-Primer

24 mer: 5' -AGA TGC ACG TAC TGC TGA AAT GAG -3' (Primer cap-8 forward # 15297*) [SEQ. ID. NO. 6]

26 mer: 5' -GTT TAG CTG TTG ATC CGT ACT TTA TT - 3'
(Primer cap-8 reverse # 15485* als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 8]

*Die Positionen beziehen sich auf die in der von Sau and Lee (1996, J. Bacteriol. 178, 2118-2126) publizierten cap-8 DNS Sequenz.

20 Synthese und Reinigung der PCR Primer Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 3

PCR-Bedingungen für den Nachweis von Staphylococcus aureus

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

Alle Komponenten wurden von der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt, bezogen. Herstellung der TaqMan-PCR-Reaktionsgemische, Durchführung der PCR Reaktionen und Bedienung der PCR Heizblocks bzw. des Fuoreszenz-Detektors (PE ABD Modell 7700 oder Modell LS50B) erfolgte nach Anweisungen des Geräteherstellers (User's Manual, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems 1997, bzw. Users Manual, PE ABI LS50 B).

Folgende Komponenten wurden in einem PCR Reaktionsgefäß (PE Applied Biosystems

Best. Nr. N8010580) gemischt:

Komponente	Volumen	Endkonzentration	Menge
DNA	(µl) 5.00	(in 50 µl)	1 for 100 ma
Bidest	10.25		1 fg - 100 ng
10 fach	5.00	1 x	
konzentrierter	3.00	1 X	
TagMan Puffer A*			
25 mM MgCl2	8.00	4 mM	
Lösung	0.00	4 111101	
DATP	2.00	200 mM	
DCTP			
	2.00	200 µM	
DGTP	2.00	200 µM	
DUTP	2.00	400 µM	
5' Primer # 15297	5.00		15 pmol
Sonde # 15460	3.00		6 pmol
3' Primer # 15485	5.00		15 pmol
Ampli Taq Gold*	0.25		
			1.25 units
AmpErase UNG*	0.50		0.50 units
Gesamtvolumen	50.00		

^{* (}aus: TaqMan PCR Core Reagents, N 8080229, PE Applied Biosystems)

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0 -15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

Die PCR-Reaktionen werden in dem PCR Heizblock des ABI Sequence Detectors 7700 durchgeführt. Funktional äquivalent sind PCR-Heizblöcke mit vergleichbaren Heiz- und Wärmetransfereigenschaften, wie z. B. die PE ABI Geräte Modell 7200, 9700, 9600 und 2400. Das PCR-Zyklusprofil ist wie folgt:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wieder- holungen
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
Cycle	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für detaillierte Erklärungen zum PCR-Zyklus-Profil siehe: User's Manual, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems 1997.

10

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

17

Beispiel 4

Selektivität des S. aureus PCR-Schnelltests

4.1 Elektrophoretische Analyse

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im PCR Test eingesetzt (Abb. 1, Sambrock et al. 1993). Die entstandenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch analysiert. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 213 Basenpaaren. Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierte, daß es sich um *cap8-0* DNA handelte (ohne Abb.)

Die DNA (10 ng pro Spur, 2-14) aller eingesetzten S. aureus Stämme (Lane 2-5) wurde von den cap8-0 Primern (# 15297 und # 15485) detektiert. Dem gegenüber wurde die DNA einer nahe verwandten Staphylococcus Art, S. epidermidis (Lane 6) und die anderer bakterieller Gattungen (Lane 7-11) nicht detektiert. DNA aus Pilz, Fisch und Mensch (Lane 12-14) wurden als Kontrollen eingesetzt und ergaben kein Detektionssignal. NTC (= no template control) ist die Wasserkontrolle, in der keine DNA eingesetzt wurde.

4.2 Fluoreszenzanalyse

20

25

30

Neben der elektrophoretischen Analyse wurde die Selektivität der diagnostischen PCR als TaqMan-Fluoreszenztest unter Verwendung der oben genannten Primer und Fluoreszenzsonde bestimmt. Die Resultate sind als Ct-Werte (Threshold cycle) angegeben.

Ct-Wert: Die bei der TaqMan-PCR stattfindende Hydrolyse der Fluoreszenzsonde führt zu einem Anstieg der Reporterfluoreszenzstrahlung von einem PCR-Zyklus zum Nächsten. Die Zyklenzahl, bei der erstmals die Reporterfluoreszenzstrahlung über der Hintergrundstrahlung (NTC) des Systems liegt und linear ansteigt, wird "Threshold cycle" (Ct) genannt. (Hintergrundstrahlung (NTC) ist die Reporterfluoreszenzstrahlung in PCR Kontrollreaktionen, in denen keine Template-DNA eingesetzt wurde.) Sowohl die Menge an freiwerdender Reporterstrahlung als auch der "Treshold cycle" (Ct-Schwellenwort Zykluszehl) eind perpettional zu der Manne der "Treshold cycle" (Ct-

Schwellenwert-Zykluszahl) sind proportional zu der Menge an entstehenden PCR Produkten und somit zu der Menge an eingesetzten Genkopien (Keimzahl). Je mehr Genkopien eingesetzt werden, desto niedriger ist der resultierende Ct-Wert. In einem PCR - System mit 100%iger Effizienz nimmt der Ct- Wert mit jeder Verdopplung der Start-Genkopienzahl um einen Zyklus ab. Bei einer PCR-Reaktion die z.B. 40 Zyklen umfaßt, und bei der kein PCR Produkt entsteht, wird der Ct-Wert per Definition 40 sein.

Es werden je 10 ng an Template-DNA in den PCR-Reaktionen für den Spezifizitätstest eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in Beispiel 3 angegeben.

Liste der getesteten DNA-Isolate

(je 10 ng genomische DNS analysiert)

5	Organismus	Resultat (als CT-Wert)
	Staphylococcus aureus Arten	(als C1-VVEIL)
	S. aureus	
	DSM 683 (ATCC 9144)	17
10	DSM 1104 (ATCC 25923)	17
	DSM 6148	17
	DSM 346 (ATCC 6538)	17
	S. epidermidis	17
	DSM 1798 (ATCC 12228)	40
15	20m 1700 (71700 12220)	40
	Andere bakterielle Gattungen	
	Organismus	Resultat
	Pseudomonas aeruginosa	(als CT-Wert)
20	DSM 1117 (ATCC 27853)	40
	DSM 1128 (ATCC 9027)	40
	DSM 3227 (ATCC 19429)	40
	DSM 50071 (ATCC 10145)	40
	Salmonella typhimurium	40
25	DSM 5569 (ATCC 13311)	40
	Dom 0000 (A100 15511)	40
	Streptococcus faecalis	
	DSM 2981 (ATCC 14506)	40
	(reclassified DSM 2570 (ATCC 29212)	40 40
30	as Enterococcus faecalis)	40
	= = = = = = = = = = = = = = = = = = =	
	DSM 6134	40
	Escherichia coli	40
	DSM 787 (ATCC 11229)	40
35	DSM 1576 (ATCC 8739)	40
	Eukaryonten	40
	Lunaryonten	
	Neurospora crassa	40
40	Mensch (Perkin Elmer ABI, 401846)	40
	Salmon (Sigma D 9156)	40
	(- 3 · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	40
	Wasser	40
		· -

Nach etwa 17 Zyklen wurde erstmals ein linearer Anstieg der FAM-Fluoreszenz über der FAM-Hintergrundstrahlung der Fluoreszenzsonde detektiert, wenn *S. aureus* genomische DNA in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt wurde. Wurde DNS von *S. epidermidis* in der PCR angesetzt, einer nahe verwandten Art von *S. aureus* innerhalb der Gattung *Staphylococcus*, so ließ sich kein signifikanter Anstieg der FAM-Reporterfluoreszenz detektieren.

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

19

Die Ergebnisse der PCR-Analyse mit DNA aus verschiedenen bakteriellen Gattungen, Staphylococcus-Arten und Staphylococcus aureus Stämmen zeigt die Spezifität des entwickelten S. aureus Tests. Nur S. aureus DNS wurde von den cap-8 Primern und Sonden detektiert.

5

Beispiel 5

Sensitivität des S. aureus Nachweisverfahrens

Um die Sensitivität des S. aureus PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische S. aureus DNA präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt.

10

20

25

30

10 fg genomische S. aureus DNA entsprechen 3 Genomen (Strauss and Falkow 1997, Science 276, 707-712).

10 fg = 3 KBE 15 10 pg = 3.000 KBE 10 ng = 3.000.000 KBE

Verschiedene Mengen an S. aureus DNA (1 fg bis 100 ng) wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 2). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte aus 6 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wurde als CT-Wert angegeben.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNA von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *S. aureus* Genome über 5 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 300.000 KBE (1ng DNS).

Beispiel 6

Nachweis von Pseudomonas aeruginosa

Der Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von *algQ*-Gensequenzen (Sequenzen s. Beispiel 24). Das *algQ*-Gen verschlüsselt Elemente eines Schutzmechanismus der von Pseudomonas aeruginosa im Laufe der Evolution entwickelt wurde, und der für diese Bakterienart spezifisch ist.

Die Produktion von Alginat ist eine einzigartige Virulenzeigenschaft von Pseudomonas aeruginosa. Alginat ist ein Polymer aus Mannuron- und Guluronsäure (1,4 glykosidisch verknüpft). Dieses Polymer bildet eine viskoses Gel auf der Bakterienoberfläche. Die Produktion dieses Biogels ist sehr sensitiv reguliert. Die Fähigkeit, Alginat zu synthetisieren, ist bei allen Pseudomonas aeruginosa Stämmen vorhanden. Sie ist charakteristisch für diese Bakterienart. Alginat-Synthese ist ein energiekonsumierender

20

Prozeß und deshalb reguliert. Ein Gen, das Alginat-Synthese reguliert, ist das *algQ* - Gen (Konyecsni and Deretic 1990, J. Bacteriol. 172, 2511-2520). Es verschlüsselt die sensorische Komponente eines Signaltransduktions-Systems (Roychoudhury et al. 1993, PNAS USA 90: 965-969). Da das *algQ*- Gen an der Regulation eines spezifischen Schutzmechanismus beteiligt ist, stellt es einen genetischen Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung der Art *Pseudomonas aeruginosa* dar.

Als Resultat von DNA-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende algQ-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

1. PCR-Sonde:

26 mer: 5'-FAM - CCA ACG CCG AAG AAC TCC AGC ATT TC - TAMRA

15 (Sonde algQ # 911): [SEQ. ID. NO. 10]

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR-Primer:

25 23 mer: 5'-CTT CGA TGC CCT GAG CGG TAT TC-3'

(Primer algQ forward # 876*) [SEQ. ID. NO. 9]

Reverse Primer Sequence (# 1147):

23 mer: 5'-CTG AAG GTC CTG CGG CAA CAG TT-3'

- 30 (Primer algQ reverse # 1147* als reverse complement einsetzen) SEQ. ID. NO. 11
 - * Positionen beziehen sich auf die in Konyecsni and Deretic 1990, J. Bacteriol. 172, 2511-2520 publizierte DNA-Sequenz.

Synthese und Reinigung der PCR Primer Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE

Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

30

35

Beispiel 7
PCR-Bedingungen für den Nachweis von *P. aeruginosa*

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration ergaben such folgende Bedingungen als optimal:

5	Komponente	Volumen	Endkonzentration	Menge
	•	(µI)	(in 50 µl)	DNA
		5.00		1 fg - 100 ng
10	Bidest	7.25		
	10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x	
	25 mM MgCl2 Lösung	g 13.00	6.5 mM	
	dATP	2.00	200 µM	
	dCTP	2.00	200 µM	
15	dGTP	2.00	200 μΜ	
	dUTP	2.00	400 µM	
	5' Primer # 876	1.00	·	3 pmol
	Sonde # 911	4.00		8 pmol
	3' Primer # 1147	5.00		15 pmol
20	AmpliTaq Gold	0.25		1.25 units
	AmpErase UNG	0.50		0.50 units
	DMSO	1,00		
		50.00		

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0-15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

Die PCR-Reaktionen werden in dem PCR Heizblock des ABI Sequence Detectors 7700 durchgeführt. Funktional äquivalent sind PCR-Heizblöcke mit vergleichbaren Heiz- und Wärmetransfereigenschaften, wie z. B. die PE ABI Geräte Modell 7200, 9700, 9600 und 2400.

Das PCR-Zyklenprofil für die Pseudomonas aeruginosa PCR ist wie folgt:

	Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholungen
40	Hold	50	2:00	1
	Hold	95	10:00	1
	Cycle	97	0:30	4
	-	60	1:00	
	Cycle	94	0:30	41
45	•	60	1:00	
	Hold	25	5:00	

rur Details zu PCR-Bedingungen siehe Beispiel 3.

Beispiel 8

Selektivität des Pseudomonas aeruginosa PCR-Schnelltests

5

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle, für Ct-Wert s. Definition Beispiel 4) angegeben .

10

Liste der getesteten DNA-Isolate (je 10 ng genomische DNS analysiert)

15	Organismus			Resultat (als CT-Wert)
	Pseudomonas A	rten		(dis O1-VVEIL)
	P. aeruginosa	DSM	1 1117 (ATCC 27853)	19
		DSM	1 1128 (ATCC 9027)	19
		DSM	1 3227 (ATCC 19429)	19
20		DSM	1 50071 (ATCC 10145)	19
	P. putida	DSM	1 50026 `	45
	P. fluoreszenz	ATC	C 948	45
	Andere bakteriell	e Arten		
25	Staphylococcus at	ureus	DSM 683	45
			DSM 1104	45
			DSM 6148	45
			DSM 6538P	45
	Streptococcus fae	calis	DSM 2981	45
30			DSM 6134	45
	_		ATCC 29212	45
	Salmonella typhim	urium	ATCC 13311	45
	Escherichia coli		DSM 301	45
			DSM 787	45
35			DSM 1103	45
			ATCC 8739	45
	Eukaryonten			
	Neurospora crassa)		45
40	Arabidopsis thaliar	na 💮		45
	Salmon (Sigma D9	1156)		45
	Mensch (Perkin Eli	mer ABI	, 401846)	45
	Wasser			45

45

Ausschließlich *Pseudomonas aeruginosa* Stämme ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 19 PCR Zyklen (CT=19) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *P. aeruginosa* DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test

war hochspezifisch. Auch die nahe verwandten Arten P. putida und P. fluoreszenz ergaben kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest.

Als Positivkontrolle wurden die selben bakteriellen DNS, die im algQ-PCR-Test analysiert worden waren mit dem universellen 16S rRNA PCR System (s. Beispiel 19) untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. Das bedeutet, alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die P. aeruginosa DNS ließen sich algQ-PCR-amplifizieren. Das algQ-System ist Pseudomonas aeruginosa spezifisch.

Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert (vgl. Beispiel 3). Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 294 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierte, daß es sich um algQ DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 9

Sensitivität und Linearität des P. aeruginosa PCR-Schnelltests 15

Um die Sensitivität des P. aeruginosa PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische P. aeruginosa DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb.3). Verschiedene Mengen an P. aerugonosa Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 3). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT-Wert angegeben. Die PCR- Reaktion wurde über 45 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 45.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten P. aeruginosa Genome über 4 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 30.000 KBE.

Beispiel 10

Nachweis von Escherichia coli 30

20

25

35

Der Nachweis von E. coli erfolgte durch erfindungsgemäße artspezifische Amplifikation von murA-Gensequenzen

Spezifische Bereiche des murA-Gens dienten als diagnostisches Ziel für die Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von Escherichia coli. Warum wurde dieses Gen als diagnostisches Ziel gewählt? Das murA Gen verschlüsselt das Enzym UDP-N-Acetylglucosamin Enolpyruvyltransferase, ein wichtiges Strukturgen von E. coli (Marquardt et al. 1992, J. Bacteriol. 174, 5748-5752). Dieses Enzym katalysiert den ersten Schritt der Peptidoglykan-Synthese, im Falle von E. coli des Mureins, welches

einen essentiellen Bestandteil der bakteriellen Zellwand darstellt. Die Zellwandkomposition ist als ein charakteristisches Merkmal von Bakterienarten anzusehen. Es wurde die *murA* Nukleotidsequenz von *E. coli* mit der nahe verwandten Enterobakteriaceaen-Art *Enterobacter cloacae* verglichen. Auf Grund der identifizierten Sequenzunterschiede wurde das *murA*-Gen als genetischer Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung der Enterobakteriaceaen-Art *Escherichia coli* ausgewählt.

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *murA*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

Forward Primer Sequence (# 767*):

5' GTT CTG TGC ATA TTG ATG CCC GCG 3'

[SEQ. ID. NO. 12]

15

10

5

Sonde (# 802):

5'-FAM - TCT GCG CAC CTT ACG ATC TGG TT - TAMRA 3' [SEQ. ID. NO. 13]

Reverse Primer Sequence (# 884):

20 5' GCA AGT TTC ACT ACC TGG CGG TTG 3'

(als reverse complement einsetzen)

[SEQ. ID. NO. 14]

- * Positionen beziehen sich auf die in Marquardt et al. 1992, J. Bacteriol. 174, 5748-5752 publizierte DNA-Sequenz (Genbank: M92358).
- Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Beispiel 11

PCR-Bedingungen für den Nachweis von Escherichia coli

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, der MgCl₂ bzw. Glycerin
Konzentration und der Nukleotidkomposition ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

25

	Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Menge
5	DNA Bidest 10 x TaqMan Puffer A 25 mM MgCl2 Lösun	5.00 8.75 A 5.00	1 x 3.5 mM	1 fg - 100 ng
10	dATP dCTP 7-deaza-dGTP dUTP	2.00 2.00 2.00 2.00	200 μM 200 μM 200 μM 400 μM	
15	Glycerin 40% 5' Primer # 767 Sonde # 802 3' Primer # 884 AmpliTaq Gold	2.50 5.00 3.00 5.00 0.25	2%	15 pmol 6 pmol 15 pmol 1.25 units
20	AmpErase UNG units	0.50 50.00	-	0.50

Das PCR-Zyklenprofil für die Escherichia coli PCR:

25

Cycle	Temperatur (C°)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
·	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Für Details siehe Beispiel 3.

30

35

Beispiel 12

Selektivität des Escherichia coli PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle) angegeben (Tab.).

Liste der getesteten DNA-Isolate

(je 10 ng genomische DNS analysiert)

5	Organismus		Resultat (als CT-Wert)
	Escherichia coli Stämme		,
	Escherichia coli		
	DSM 301		16
• •	DSM 787		16
10	DSM 1103		16
	ATCC 8739		16
	Andere Enterobacteriaceae		
	Acetobacter pasteurianus	DSM 3509	40
15	Acinetobacter calcoaceticus	DSM 6962	40
	Aeromonas enteropelogenes	DSM 6394	40
	Alcaligenes faecalis	DSM 30030	40
	Budvicia aquatica	DSM 5075	40
	Buttiauxella agrestis	DSM 4586	40
20	Cedecea davisae	DSM 4568	40
	Chromobacterium violaceum	DSM 30191	40
	Enterobacter cloacae Edwardsiella tarda	DSM 30054	40
		DSM 30052	40
25	Ewingella americana Erwinia amylovora	DSM 4580	40
23	Hafnia alivei	DSM 30165 DSM 30163	40
	Haemophilus influenzae	DSM 4690	40
	Halomonas elongata	DSM 2581	40 40
	Helicobacter pylori	DSM 4867	40 40
30	Kluyvera ascorbata	DSM 4611	40
	Leclercia adecarboxylata	DSM 5077	40
	Legionella pneumophilia	DSM 7515	40
	Leminorella grimontli	DSM 5078	40
	Levinea malonatica	DSM 4596	40
35	Listeria monocytogenes	DSM 20600	40
	Moellerella wisconsensis	DSM 5076	40
	Morganella morganii sp.	DSM 30164	40
	Pantoea agglomerans	DSM 3493	40
	Photorhabdus luminescens	DSM 3368	40
40	Plesiomonas shigelloides	DSM 8224	40
	Pragia fontium	DSM 5563	40
	Providencia stuarti	DSM 4539	40
	Proteus mirabilis	DSM 788	40
	Rhanella aquatilis	DSM 4594	40
45	Serratia marcescens	DSM 30121	40
	Tatumelia ptyseos	DSM 5000	40
	Vibrio proteolyticus	DSM 30189	40
	Xenorhabdus nematophilus	DSM 3370	40
50	Yersinia enterocolitica	DSM 4780	40
50	Andere bakterielle Arten		
	Pseudomonas aeruginosa	DOM 1139 (ATCC 0037)	40
	Bacillus subtilis	DSM 1128 (ATCC 9027)	
	Davinus subtilis		40

WO 99/58713		27	PCT/DE99/01471
	Salmonella typhimurium	ATCC 13311	40
	Pseudomonas mirabelis Staphylococcus aureus	DSM 788 DSM 6538P	40 40
	Streptococcus faecalis	DSM 2981	40
5	Klebsiella pneumonia	ATCC 10031	40
	Citrobacter freundii	DSM 30040	40
	Eukaryonten		
	Neurospora crassa		40
10	Arabidopsis thaliana		40
	Salmon (Sigma D9156)		40
	Mensch (Perkin Elmer ABD	, 401846)	40
	Wasser		40

20

25

30

Lediglich *Escherichia coli* Stämme ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 16 PCR Zyklen (CT=16) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng *Escherichia coli* DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test war hochspezifisch. Auch ein nahe verwandte Enterobacteriaceaen-Art, *Enterobacter cloacae*, ergab kein Fluoreszenzsignal im PCR-Schnelltest (Tab.).

Als Positivkontrolle wurden dieselben bakteriellen DNS, die im *murA*-PCR-Test analysiert worden waren (Tab.) mit dem universellen 16S rRNA PCR System (s. Beispiel 19) untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. D. h. alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die *Escherichia coli* DNS ließen sich *murA*-PCR-amplifizieren.

Das *murA*-System ist spezifisch für *Escherichia coli*. Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert (vgl. Bericht *Staphylococcus aureus*). Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 142 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten, daß es sich um *murA* DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 13

Sensitivität des E. coli Test

Um die Sensitivität des Escherichia coli PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische Escherichia coli DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb. 4).

Verschiedene Mengen an Escherichia coli Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 4). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT angegeben. Die PCR Reaktion wurde über 40 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 40.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten *Escherichia coli*-Genome über 6 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 3.000000 KBE.

5

Beispiel 14

Nachweis von Salmonella ssp. (Subspezies)

Der Nachweis von Salmonella spp. der Art Salmonella enterica erfolgte durch erfindungsgemäße spezifische Amplifikation von *invA*-Gensequenzen

10

15

20

25

Spezifische Bereiche des invA Gens dienten als diagnostisches Ziel für die Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von Salmonella spp. Warum wurde dieses Gen als diagnostisches Ziel gewählt? Das invA Gen verschlüsselt einen Salmonella-spezifischen Virulenzfaktor. Verschiedene Untersuchungen an einer Reihe von Salmonellen haben gezeigt, daß diese Bakterienarten an Epithelzellen binden. Bei diesem Prozeß wird das Actin-System der Wirtszellen von den Bakterien beeinflußt. Als Reaktion umschließen die Wirtszellen die Bakterienzellen. Nach vollständigem Einschluß existieren die Bakterien in Vesikeln im Zytoplasma der Wirtszellen. An diesem Einschließungsprozeß (engl. invasion) sind die sogenannten inv Gene (invA-H) von Salmonella beteiligt. Mutanten in dem invA Gen binden noch an Wirtszellen, werden von diesen aber nicht mehr aufgenommen. Die inv Gensequenz Salmonella Subspezies stark konserviert erhalten (Salyers and Whitt 1994, Salmonella Infection, in: Bacterial Pathogenesis ASM Press, Washington D.C. p233). Das invA Gen von Salmonella wurde isoliert und die Nukleotidsequenz aufgeklärt (Galan and Curtis 1989, PNAS USA 86: 6383-7, Galan and Curtis 1991, Infection and Immunity 59: 2901-2908, und siehe: Rahn et al. 1992, Mol. Cell. Probes 6: 271-279). Da das invA Gen an der Expression eines spezifischen Virulenzmechanismus von Salmonellen beteiligt ist, stellt genetischen Marker mit diagnostischer Potenz zur Identifizierung von Salmonella ssp. dar (Rahn et al. 1992, Mol. Cell. Probes. 6: 271-279).

30

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende *invA*-spezifische DNA-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

35 Forward Primer Sequence (# 269*):

5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC 3'

[SEQ. ID. NO. 15]



Sonde (# 333):

5'-FAM - CTT CTC TAT TGT CAC CGT GGT CCA - TAMRA 3' [SEQ. ID. NO. 16]

29

Reverse Primer Sequence (# 542):

- 5' GGT TCC TTT GAC GGT GCG ATG AAG 3' (als reverse complement einsetzen) [SEQ. ID. NO. 17]
 - * Positionen beziehen sich auf die in Boyd et al. 1996, Appl. Environ. Microbiol. 62: 804-808 publizierte DNA-Sequenz (Genbank: U43237).
- Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert wurden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Beispiel 15
PCR-Bedingungen für den Nachweis von Salmonellen

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration ergaben such folgende Bedingungen als optimal:

	Komponente	Volumen (µI)	Endkonzentration (in 50 µl)	Men	ge
25					
	DNA	5.00		1 fa -	100 ng
	Bidest	11.25		J	
	10 x TaqMan Puffer A	5.00	1 x		
	25 mM MgCl2 Lösung	7.00	3.5 mM		
30	dATP	2.00	200 µM		
	dCTP	2.00	200 µM		
	dGTP	2.00	200 µM		
	dUTP	2.00	400 µM		
	5' Primer # 269	5.00		15	pmol
35	Sonde # 333	3.00		6	pmol
	3' Primer # 542	5.00		15	pmol
	AmpliTaq Gold	0.25		1.25 u	ınits
	AmpErase UNG	0.50		0.50 ປ	ınits
					
40		50.00			

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholung	
Hold	50	2:00	1	
Hold	95	10:00	1	
Cycle	95 60	0:15 1:00	40	
Hold	25	5:00		

Für Details siehe Beispiel 3.

10

5 Beispiel 16

Selektivität des Salmonella ssp. PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA aus verschiedenen Organismen isoliert und im Fluoreszenz-PCR Test eingesetzt. Die Menge an entstandenen PCR Produkten wurde als CT-Wert (Threshold Cycle) angegeben (CT- Definition s. Beispiel 4).

Liste der getesteten DNA-Isolate

(je 10 ng genomische DNS analysiert)

Subspezies 20 Salmonella typhimurium ATCC 13311 15 Salmonella typhi 15 Salmonella agona 15 Salmonella borismorbificans 15 Salmonella anatum 15 Salmonella brandenburg 15 Salmonella brandenburg 15 Salmonella derby 15 Salmonella montevideo 15 Salmonella newport 15 Salmonella parathyphi B 15 Salmonella parathyphi B 15 Salmonella dublin 15 Salmonella dublin 15 Salmonella enteritidis 15 Salmonella hadar 15 Salmonella infantis 15 Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40	15	Organismus		Resultat (als CT-Wert)
Salmonella typhimurium ATCC 13311 15 Salmonella typhi 15 Salmonella agona 15 Salmonella borismorbificans 15 Salmonella anatum 15 Salmonella brandenburg 15 Salmonella derby 15 Salmonella montevideo 15 Salmonella newport 15 Salmonella parathyphi B 15 Salmonella pullorum 15 Salmonella dublin 15 Salmonella enteritidis 15 Salmonella hadar 15 Salmonella infantis 15 Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Salmonella enterica		
Salmonella typhi Salmonella agona Salmonella borismorbificans Salmonella borismorbificans Salmonella anatum 15 Salmonella brandenburg Salmonella brandenburg Salmonella derby Salmonella montevideo Salmonella newport Salmonella parathyphi B 15 Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Subspezies		
Salmonella agona Salmonella borismorbificans Salmonella borismorbificans Salmonella anatum 15 Salmonella brandenburg 15 Salmonella derby Salmonella montevideo Salmonella newport Salmonella parathyphi B 15 Salmonella pullorum 15 Salmonella dublin Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis 15 Salmonella infantis	20	Salmonella typhimurium	ATCC 13311	15
Salmonella borismorbificans Salmonella anatum 15 Salmonella brandenburg 15 Salmonella brandenburg 15 Salmonella derby Salmonella montevideo Salmonella newport Salmonella parathyphi B 15 Salmonella pullorum 15 Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella enteritidis Salmonella infantis 15 Salmonella infantis 15 Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Salmonella typhi		15
Salmonella anatum Salmonella brandenburg Salmonella derby Salmonella montevideo Salmonella newport Salmonella parathyphi B Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 15		Saimonella agona		15
Salmonella brandenburg Salmonella derby Salmonella montevideo Salmonella newport Salmonella parathyphi B Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 15 15 15 16 17 18 18 18 19 19 19 10 10 10 11 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15		Salmonella borismorbificans	S	15
Salmonella derby Salmonella montevideo Salmonella newport Salmonella parathyphi B Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 15 15 15 16 17 18 18 19 19 19 10 10 10 11 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15		Salmonella anatum		15
Salmonella montevideo Salmonella newport Salmonella parathyphi B Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 15 15 16 17 18 18 19 19 19 10 10 11 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15 15	25	Salmonella brandenburg		15
Salmonella newport Salmonella parathyphi B Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 15 40		Salmonella derby		15
Salmonella parathyphi B Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 15 40		Salmonella montevideo		15
Salmonella pullorum Salmonella dublin Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 15 40		Salmonella newport		15
Salmonella dublin 15 Salmonella enteritidis 15 Salmonella hadar 15 Salmonella infantis 15 Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Salmonella parathyphi B		15
Salmonella enteritidis Salmonella hadar Salmonella infantis Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40	30	Salmonella pullorum		15
Salmonella hadar 15 Salmonella infantis 15 Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Salmonella dublin		15
Salmonella infantis 15 Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Salmonella enteritidis		15
Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Salmonella hadar		15
Andere bakterielle Arten Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40		Salmonella infantis		15
Pseudomonas aeruginosa DSM 1117 (ATCC 27853) 40	35			
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		Andere bakterielle Arten		
		Pseudomonas aeruginosa	DSM 1117 (ATCC 27853)	40
DSM 1128 (ATCC 9027) 40		,	DSM 1128 (ATCC 9027)	40

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

31

		DSM 3227 (ATCC 19429)	40
		DSM 50071 (ATCC 10145)	40
	Pseudomonas mirabelis	DSM 788	40
	Staphylococcus aureus	DSM 683	40
5		DSM 1104	40
		DSM 6148	40
	04	DSM 6538P	40
	Streptococcus faecalis	DSM 2981	40
10		DSM 6134	40
10	Escherichia coli	ATCC 29212	40
	Escherichia coli	DSM 301	40
		DSM 787	40
		DSM 1103 ATCC 8739	40
15	Enterobacter cloacae	DSM 30054	40
13	Klebsiella pneumonia	ATCC 10031	40
	Citrobacter freundii	DSM 30040	40 40
	Oll obacie: nearlan	D3W 30040	40
	Eukaryonten		
20	Neurospora crassa		40
	Arabidopsis thaliana		40
	Salmon (Sigma D9156)		40
	Mensch (Perkin Elmer ABI	D, 401846)	40
	Wasser	-	40
25			

Lediglich Salmonellen ergaben ein positives Ergebnis im PCR-Schnelltest. Nach 15 PCR Zyklen (CT=15) war erstmals ein linearer Anstieg der Fluoreszenz meßbar, wenn 10 ng Salmonella ssp. DNS eingesetzt wurden. Der PCR Test war hochspezifisch. Auch die nahe verwandten Escherichia coli Stämme ergaben kein Fluoreszenzsignal im

30 PCR-Schnelltest.

35

40

Als Positivkontrolle wurden dieselben bakteriellen DNS, die im *invA-*PCR-Test analysiert worden waren mit dem universellen 16S rRNA PCR System untersucht. Alle bakteriellen DNS ergaben ein positives Signal mit dem 16S rRNA System. D. h. alle DNS ließen sich 16S rRNA-PCR-amplifizieren, aber lediglich die *Salmonella* DNS ließen sich invA-PCR-amplifizieren.

Das invA-System ist spezifisch für Salmonella.

Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert. Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 287 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen der PCR-Produkte verifizierten, daß es sich um *invA* DNS handelte (ohne Abb.)

Beispiel 17

Sensitivität des PCR-Schnelltests

Um die Sensitivität des Salmonella ssp. PCR-Tests zu bestimmen, wurde genomische Salmonella typhimurium DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt (Abb. 5).

Verschiedene Mengen an Salmonella typhimurium Genomkopien wurden in der Fluoreszenz-PCR eingesetzt (Abb. 5). Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Experimenten dar. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz und somit an entstehenden PCR-Produkten wird als CT angegeben. Die PCR Reaktion wurde über 40 Zyklen durchgeführt. Der CT-Wert der Wasserkontrolle (NTC = no template control) betrug 40.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 3 Bakterienzellen mittels Fluoreszenz-PCR nachweisen läßt. Der PCR-Schnelltest erlaubt eine lineare Quantifizierung der eingesetzten Salmonella typhimurium Genome über 6 log Stufen, d. h. zwischen 3 und 3.000000 KBE.

Beispiel 18

DNA-Freisetzung ohne Voranreicherung in Nährmedien

DNS aus verschiedenen Testmikroorganismen wurde entsprechend Boom et al.,1990, extrahiert, von Proteinen und sonstigen PCR-Inhibitoren gereinigt (Quiagen Säulen Kit, 1995) und in PCR Amplifikationsexperimenten eingesetzt.

Beispiel 19

Nachweis von Bakterien universell

Der Nachweis von Bakterien erfolgte durch erfindungsgemäße spezifische Amplifikation von konservierten 16S rRNA Gensequenzen (SEQ. ID. NO. 5, siehe Beispiel 24).
 Bestimmte 16S rRNA-spezifische DNA-Sequenzen haben sich im Laufe der Evolution konserviert, sind deshalb im Genom aller Bakterien vorhanden und können als Primer und Sonden zum universellen Nachweis von Bakterien eingesetzt werden (Relman 1993, Weisburg et al.1991, J. Bacteriol. 173).

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischen Optimierungsarbeiten, unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende 16S rRNA-spezifische DNA-Sequenzen als optimales Primer-/SondenKombination bestimmt:

1. PCR Sonde

30

35

23 mer: 5'- FAM - TTA AGT CCC GCA ACG AGC GCA AC - TAMRA - 3'

(Sonde 16S rRNA # 1090): [SEQ. ID. NO. 19] Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert worden. Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

2. PCR Primer

19 mer: 5'- **GCA TGG CTG TCG TCA GCT C - 3**' (Primer 16S rRNA forward # 1053*) [SEQ. ID. NO. 18]

5

20 mer: 5'- **TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG** - 3' (Primer 16S rRNA reverse # 1386*) [SEQ. ID. NO. 20]

* Positionen beziehen sich auf die DNS Sequenz des 16S rRNA Gens (E. coli in Weisburg et al.1991, J. Bacteriol. 173)

Synthese und Reinigung der PCR -Primer -Oligonukleotide erfolgte durch die Firma PE Applied Biosystems und nach deren Protokollen.

Beispiel 20

15 PCR Bedingungen für den Nachweis von Bakterien universell

Nach Variation von Primer- und Sondenkonzentration, und MgCl₂ Konzentration Temperatur und Zyklenprofil der PCR und Abstand des Reporterfarbstoffs zum Quencherfarbstoff innerhalb der Sonde ergaben sich folgende Bedingungen als optimal:

Folgende Komponenten wurden in einem PCR Reaktionsgefäß (PE Applied Biosystems Best. No. N8010580) gemischt.:

	Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration (in 50 µl)	Meng	е
25					
	DNA	1.00		1 fg -	100 ng
	Bidest Wasser	17.25			
	10 x TaqMan Puffer	A 5.00	1 x		
	25 mM MgCl ₂ Lösun	g 11.00	5.5 mM		
30	dATP	1.00	200 μM		
	dCTP	1.00	200 µM		
	dGTP	1.00	200 µM		
	dUTP	1.00	400 µM		
	5' Primer #1053	5.00	400 nM	20	pmol
35	Sonde #1090	1.00	40 nM	2	pmol
	3' Primer #1386	5.00	400 nM	20	pmol
	AmpliTaq	0.25		1.25 ເ	units
	AmpErase UNG	0.50		0.50 ເ	units
40		50.00			

Für eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist darauf zu achten, daß bei jedem PCR-Lauf möglichst viele Komponenten des PCR-Mixes in einem sogenannten

15

20

30

Mastermix vorgemischt werden. Unter Standardbedingungen wird nur das zu untersuchende DNA-Material (0-15.25 µl) als Komponente in jedes PCR Reaktionsgefäß separat zugeben.

5 Das PCR-Zyklusprofil ist wie folgt:

Cycle	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Wiederholung
Hold	50	2:00	1
Hold	95	10:00	1
Cycle	95	0:15	40
Cycle	60	1:00	
Hold	25	5:00	

Dieses Schema ist kompatibel für PCR-Geräte mit Heizblock, wie z.B.: GeneAMP PCR Geräte 2400 und 9600 und das ABI Prism 7700 Sequence Detection System von Perkin Elmer. Für Details siehe Beispiel 3.

Nach Abschluß der PCR Reaktionen wurden die Proben in das Fluorimeter LS-50B, mit Zusatz zur Detektion von Fluoreszenz in Mikrotiterplatten der Firma Perkin Elmer transferiert. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt nach Angaben des Herstellers (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Beispiel 21

Selektivität des universellen bakteriellen PCR-Schnelltests

Um die Selektivität des PCR-Tests abzuschätzen, wurde genomische DNA von verschiedenen Organismen isoliert und in dem universellen PCR-Test eingesetzt (Abb. 6). Die Menge an entstandenen PCR-Produkten wird in relativen Fluoreszenzeinheiten angegeben (Abb. 6)

Der entwickelte PCR Test detektiert selektiv Bakterien.

- 25 Die unterschiedlichen Signalintensitäten der bakteriellen Proben reflektierten die eingesetzten variablen DNA-Mengen.
 - Die entstandenen PCR-Produkte wurden elektrophoretisch analysiert. Die PCR Produkte hatten eine Größe von 330 Basenpaaren (ohne Abb.). Kontrollsequenzierungen dieser PCR-Produkte ergaben, daß es sich tatsächlich um 16S rRNA handelte (ohne Abb.). Der PCR-Schnelltest ist 16S rRNA-spezifisch.



PCT/DE99/01471 WO 99/58713

35

Beispiel 22

Sensitivität und Linearität des Schnelltests zum Nachweis von Bakterien

Um die Sensitivität des PCR Tests zu bestimmen, wurde Salmonella DNS präpariert und in PCR-Experimenten eingesetzt. Es wurden verschiedene Verdünnungen der DNS hergestellt. Jede Verdünnung wurde dreifach parallel hergestellt und in dem PCR-Test eingesetzt (Abb. 7). Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz wird als sogenannter RQ Wert angegeben.

Der RQ Wert ist die Differenz zwischen der Reporter-(R) Fluoreszenzstrahlung in einer PCR Reaktion, in der Template DNS (hier genomische Salmonella DNS) eingesetzt wurde (R+) und der Reporter-Fluoreszenzstrahlung, in einer PCR-Reaktion, in der keine DNS eingesetzt wurde (R-). R- entspricht also der Hintergrundsstrahlung. Die Reporter-Strahlung (R) wird jeweils zur Quencher-Stahlung (Q) ins Verhältnis gesetzt. Die Quencher-Strahlung ändert sich während der PCR-Reaktion nicht und stellt somit einen internen Standard dar, gegen den normiert wird.

Das Ergebnis zeigt, daß sich die DNS von 1-3 Salmonella Bakterien mittels 15 Fluoreszenz-PCR nachweisen ließ. Die Fluoreszenzstrahlung, die nach 40 PCR Zyklen entsteht, liegt signifikant über der Hintergrundstrahlung.

Der Fluoreszenz-PCR-Test erlaubt die lineare Quantifizierung der eingesetzten Salmonella Genome über mindestens 4 log Stufen d. h. zwischen 1-3 und 30.000 KBE (Abb. 7).

Beispiel 23

Produktprüfung mit dem bakteriellen Schnelltest

Die Anwendung des entwickelten PCR-Schnelltests wurde durch spiking Experimente 25 untersucht. 10 ml WFI (Wasser für Injektionszwecke, Chargen Nr. 63022) wurden mit 50 KBE Salmonellen gespikt (5 KBE/ml). DNS wurde aus den verschiedenen, gespikten Proben präpariert (Boom et al. 1990), gereinigt (Qiagen 1995) und im PCR-Schnelltest analysiert (Abb. 8).

30

35

10

20

im Prüfprodukt nachweisen. sich Die gespikten Salmonellen ließen Nachweismenge betrug 90% der eingesetzten DNA-Menge (Abb. 8). Dieser Wert reflektiert die Materialverluste, die bei der DNS Präparation aus den gespikten Produkten auftreten. Trotz dieser Verluste ließen sich 1-3 KBE/ml in dem gespikten Prüfprodukt nachweisen. Auf der anderen Seite waren im nicht-gespikten Prüfprodukts keine Salmonella Keime detektierbar (Abb. 8). Die Sterilität des Prüfprodukts wurde durch Membranfiltration entsprechend der Methoden in der EP (1997) nachgewiesen.

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

Beispiel 24

Target-Gen-, Primer- und Sondensequenzen für die verschiedenen Organismen / - gruppen

SEQ. ID. NO. 1 Staphylococcus aureus

5' AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAGCT AATGGAAAAC ACATATAGAG

ACGTGAATAT TGCTTTAGCT AATGAATTAA CAAAAATTTG CAATAACTTA

AATATTAATG TATTAGTTGT GATTGAAATG GCAAACAAAC ATCCGCGTGT

TAATATCCAT CAACCTGGTC CAGGAGTAGG CGGTCATTGT TTAGCTGTTG

ATCCGTACTT TATT 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 6 5' AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG 3'

SEQ. ID. NO. 7 5'- TAMRA - CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG - FAM -3'

15 (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 8 5' GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT 3' (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 2 Pseudomonas aeruginosa

- 25 CACGAACGCT 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)
 SEQ. ID. NO. 9 5' CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC 3'
 SEQ. ID. NO. 10 5' FAM CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC TAMRA 3'
 SEQ. ID. NO. 11 5' CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT 3' (als reverse complement einsetzen)
- SEQ. ID. NO. 3 Escherichia coli
 5' AAAGTAGAAC GTAATGGTTC TGTGCATATT GATGCCCGCG ACGTTAATGT
 ATTCTGCGCA CCTTACGATC TGGTTAAAAC CATGCGTGCT TCTATCTGGG
 CGCTGGGGCC GCTGGTAGCG CGCTTTGGTC AGGGGCAAGT TTCACTACCT
 GGCGGTTGTA CGATCGGTGC GCGTCCGGTT GATCTACACA TTTCTGGCCT

35 CGAACAATTA GGCGCGACCA TC 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

SEQ. ID. NO. 12 5' GTTC TGTGCATATT GATGCCCGCG 3' SEQ. ID. NO. 13 5' - FAM - TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT - TAMRA - 3' SEQ. ID. NO. 14 5' GCAAGT TTCACTACCT GGCGGTTG 3 (als reverse complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 4 Salmonella ssp.

5' TGATTGAAGC CGATGCCGGT GAAATTATCG CCACGTTCGG GCAATTCGTT ATTGGCGATA GCCTGGCGGT GGGTTTTGTT GTCTCTCTA TTGTCACCGT **GGTCCAGTTT ATCGTTATTA CCAAAGGTTC AGAACGTGTC GCGGAAGTCG** CGGCCCGATT TTCTCTGGAT GGTATGCCCG GTAAACAGAT GAGTATTGAT GCCGATTTGA AGGCCGGTAT TATTGATGCG GATGCCGCGC GCGAACGGCG AAGCGTACTG GAAAGGGAAA GCCAGCTTTA CGGTTCCTTT GACGGTGCGA **TGAAGTTTAT** 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen) SEQ. ID. NO. 15 5' GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC 3'

SEQ. ID. NO. 16 5' - FAM - CTTCTCTATT GTCACCGTGG TCCA - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 17 5' GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG 3' (als reverse 15 complement einsetzen)

SEQ. ID. NO. 5

10

20

Bakterien

5' GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATCCTT TGTTGCCAGC GGTCCGGCCG GGAACTCAAA GGAGACTGCC AGTGATAAAC TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT ACGACCAGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGCATACAAA GAGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG CGTCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGA ATGCCACGGT GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC

CCGTCA 3' (Primer und Sondensequenzen sind unterstrichen)

(am Beispiel E. coli, Weisburg et al. 1991, J. Bakteriol. 173: 598.)

SEQ. ID. NO. 18 5' GCATGGCTGT CGTCAGCTC 3'

SEQ. ID. NO. 19 5' - FAM - TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC - TAMRA - 3'

SEQ. ID. NO. 20 5' CTTGTACACA CCGCCCGTCA 3' (als reverse complement

30 einsetzen)

Beispiel 25

Varianten in den Primer- und Sondensequenzen.

Als Varianten werden die Primer- / Sondensequenzkombinationen definiert, die die Target-DNA-Sequenzen mit gleicher Spezifität (100%) und vergleichbarer Sensitivität (>70%) detektieren, wie die in Beispiel 24 angegebenen Sequenzen.

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

Forward Primer

30

Sonde

Reverse Primer

- Staphylococcus aureus (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 3)
 [SEQ.ID.NO 6]AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG/[SEQ.ID.NO 7]TAMRACCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 8]GTTTAGCTGT
 TGATCCGTAC TTTATT
- 10 [SEQ.ID.NO 6] AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG /[SEQ.ID.NO 7]TAMRA-CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 23]
 CATTGTTTAGCTGT TGATCCGTAC T

[SEQ.ID.NO 24]GCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAG/[SEQ.ID.NO

7]TAMRA-CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG-FAM / [SEQ.ID.NO 8]GTTTAGCTGT
TGATCCGTAC TTTATT

Pseudomonas aeruginosa (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 7)
[SEQ.ID.NO 9]CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 10]FAM
CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 11]CTGAAGGTCC

TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 25]CAGGCCTTCG ATGCCCTGA GC /[SEQ.ID.NO 10]FAM-CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 11]CTGAAGGTCC 25 TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 9]CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 10]FAM-CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 26]GCTGAAGGTCC TGCGGCAACA G

Escherichia coli (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 11)

[SEQ.ID.NO 12]GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG/[SEQ.ID.NO 13]FAMTCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA/[SEQ.ID.NO 14]GCAAGTTTCA

35 CTACCTGGCG GTTG

.--

[SEQ.ID.NO 27] TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/[SEQ.ID.NO 13] FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA /[SEQ.ID.NO 14] GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

5

- [SEQ.ID.NO 12]GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG /[SEQ.ID.NO 13]FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA/[SEQ.ID.NO 28]CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG
- [SEQ.ID.NO 27]TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/ [SEQ.ID.NO 13]FAMTCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA /[SEQ.ID.NO 28]CTGGCCTCGA
 ACAATTAGGC GCG

Salmonella ssp (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 15)

- [SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 16]FAM-CTTCTCTATTGTCACCGTGG TCCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG
- [SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC / [SEQ.ID.NO 21]

 20 FAM-TT(T/C)GTTATTGGCGATAGCCTGGC-TAMRA /[SEQ.ID.NO 17]

 GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG
 - [SEQ.ID.NO 15]GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 22]
 TAMRA-TTCTCTGGATGGTATGCCCGGTA-FAM /[SEQ.ID.NO 17]
- 25 GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

Bakterien (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 20)

[SEQ.ID.NO 18]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19]FAMTTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA
CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 29]TGCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19]FAMTTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA
CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 18]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 30]FAM-TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]CTTGTACACA CCGCCCGTCA

5

Enterobacteriaceae (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 30)

Varianten in den Primer- und Sondensequenzen

[SEQ.ID.NO 44]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46]FAM
TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT

CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 50]GTGCTGCATG GCTGTCGTC / [SEQ.ID.NO 46]FAMTTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT

CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 44]GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 51]FAM-AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45]TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

20

Beispiel 26

Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen.

Als Fehlvarianten werden die Primer- / Sondenkombinationen definiert, die die Target-DNA-Sequenzen mit nicht zufriedenstellender Spezifität (<100%) und Sensitivität (<70%) detektieren, wie die in Beispiel 24 angegebenen Sequenzen. vgl. Figur mit Primern und Sonden

Forward Primer

Sonde

Reverse Primer

Staphylococcus aureus (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 3)
[SEQ.ID.NO 31]ATGCACGTAC TGCTGAAATG AG / [SEQ.ID.NO 32]
FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC- TAMRA / [SEQ.ID.NO 33]
GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TT

20

25

30

[SEQ.ID.NO 6]AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG /[SEQ.ID.NO 32]

FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 23]

CATTGTTTAGCTGT GATCCGTAC T

[SEQ.ID.NO 24]GCACGT ACTGCTGAAA TGAGTAAG/[SEQ.ID.NO 32]

FAM-AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 8]

GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT

Pseudomonas aeruginosa (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 7)
[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 34] FAM

- CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG- TAMRA /[SEQ.ID.NO 1]

CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 35] CAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC/[SEQ.ID.NO 34]
FAM-CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 11]
CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 36] FAM-AACGCCGA AGAACTCCAG CATTTCTGC-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 26] GCTGAAGGTCC TGCGGCAACA G

[SEQ.ID.NO 9] CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC/[SEQ.ID.NO 36] FAM-AACGCCGA AGAACTCCAG CATTTCTGC-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 11]
CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

Escherichia coli (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 11)

[SEQ.ID.NO 12] GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG / [SEQ.ID.NO 13]
FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA / [SEQ.ID.NO 37]
CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

[SEQ.ID.NO 27] TAGAACGTAA TGGTTCTGTGC AT/[SEQ.ID.NO 38]

FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 14]

GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

[SEQ.ID.NO 12] GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG/[SEQ.ID.NO 38] FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 37] CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

5

20

30

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG /[SEQ.ID.NO 13]
FAM-TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT-TAMRA / [SEQ.ID.NO 28]
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]
FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 28]
CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]

FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 37]

CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA

[SEQ.ID.NO 39] ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG/[SEQ.ID.NO 38]

FAM-CCGCTGGTAG CGCG(T/C)TTTGG TCA-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 14]

GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

Salmonella ssp (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 15)

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 16]

FAM-CTTCTCTATTGTCACCGTGG TCCA-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]

GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 21]
FAM-TT(T/C)GTTATTGGCGATAGCCTGGC-TAMRA/ [SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 22]
TAMRA-TTCTCTGGATGGTATGCCCGGTA-FAM /[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

[SEQ.ID.NO 40] TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT/[SEQ.ID.NO 41]
FAM-TTTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

5

[SEQ.ID.NO 15] GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC/[SEQ.ID.NO 41]
FAM-TTTGTTGTCT TCTCTATTGT CACC-TAMRA/[SEQ.ID.NO 17]
GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG

10 Bakterien (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 20)

[SEQ.ID.NO 18] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 42] AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

15

[SEQ.ID.NO 29] TGCATGGCTG TCGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 19] FAM
- TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 42]
AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

20 [SEQ.ID.NO 43] GGATTAGATA CCCTGGTAGT C / [SEQ.ID.NO 30] FAM
- TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 20]
CTTGTACACA CCGCCCGTCA

[SEQ.ID.NO 43] GGATTAGATA CCCTGGTAGT C / [SEQ.ID.NO 30] FAM

25 - TTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGC - TAMRA / [SEQ.ID.NO 42]

AAGTCGTAAC AAGGTAACCA

Enterobacteriaceae (PCR-Bedingungen wie in Beispiel 30)

30 [SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46] FAMTTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT
CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 52] FAM-ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

- [SEQ.ID.NO 50] GTGCTGCATG GCTGTCGTC / [SEQ.ID.NO 52] FAM-ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACG-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT CCGCTTGCTC
- [SEQ.ID.NO 53] GCTGTCGTCA GCTCGTGTT / [SEQ.ID.NO 46] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 45] TTTATGAGGT 10 CCGCTTGCTC

[SEQ.ID.NO 53] GCTGTCGTCA GCTCGT GTT / [SEQ.ID.NO 46] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA / [SEQ.ID.NO 54] AACTTTATGA GGTCCGCTTG C

[SEQ.ID.NO 44] GCATGGCTGT CGTCAGCTC / [SEQ.ID.NO 46] FAM-TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC-TAMRA /[SEQ.ID.NO 54] AACTTTATGA GGTCCGCTTG C

20

25

15

Entwicklung eines PCR-Schnelltests zum Nachweis von Enterobacteriaceae

Die nachfolgenden Beispiele beschreiben den entwickelten Schnelltest inklusiv aller Sequenzvariationen und Targetsequenzen.

- (I) Schnelltest zum Nachweis von Enterobacteriaceae mit Angabe der Target-Sondenund Primersequenzen (Beispiele 27-31)
- (III) Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen (Beispiel 32)

30

35

Beispiel 27

Nachweis von Arten der Familie Enterobacteriaceae

Für die Entwicklung eines diagnostischen PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurde ein Gen gesucht, das auf der einen Seite genügend konservierte Bereiche aufweisen konnte, um die zahlreichen Arten der Familie Enterobacteriaceae nachweisen zu können, das auf der anderen Seite aber auch ausreichend variable Bereiche enthalten mußte, um die Detektion der nicht zu den Enterobacteriaceae gehörenden Bakterien ausschließen zu können. Mit dem bakteriellen 16S rRNA-Gen wurde ein Target gewählt, das beide Bedingungen erfüllt.

Das 16S rRNA-Gen kodiert für die bakterielle ribosomale DNA, die zusammen mit der 23S rRNA und der 5S rRNA in Kombination mit den ribosomalen Proteinen den Translationsapparat für die Proteinbiosynthese bilden.

Als Resultat von DNS-Sequenzdatenbank-Vergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten unter Verwendung verschiedener Primer- und Sondenkombinationen, wurden folgende spezifische DNS-Sequenzen als optimale Primer- / Sonden Kombination bestimmt:

Als Ergebnis von Sequenzvergleichen und praktischer Optimierungsarbeiten wurde für den Nachweis von Enterobacteriaceae folgende optimale Kombination von Primern und Sonde ermittelt:

Forward-Primer (#1053) 5'-GCA TGG CTG TCG TCA GCT C-3' [SEQ. ID. NO. 44]

Reverse-Primer (#1270) 5'-TTT ATG AGG TCC GCT TGC TC-3' [SEQ. ID. NO.45]

Sonde (#1090) 5'-Fam-TTA AGT CCC GCA ACG AGC GCA AC-Tamra-3' [SEQ. ID. NO. 46]

20

10

Die Sonden wurden von der Firma PE Applied Biosystems Division, Weiterstadt, Deutschland hergestellt. Es handelt sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die am 5' Ende mit einem Fluoreszenzderivat (FAM = 6-carboxyfluorescein) und am 3' Ende mit einem Rhodaminderivat (TAMRA = 6-carboxytetramethylrhodamine) modifiziert wurden.

25 Synthese und Reinigung erfolgte entsprechend der Vorschriften von PE-Applied Biosystems.

Die numerischen Bezeichnungen der Oligonukleotide beziehen sich auf die Positionen des Leitstranges der von Brosius et al. 1978 veröffentlichten Sequenz für die 16S rRNA von *Escherichia coli*.

Die Lokalisation dieser Sequenzen innerhalb des 16S rRNA-Gens ist in SEQ. ID. NO. 24 dargestellt. Die Größe des durch die Primer 1053 und 1270 begrenzten Amplikons beträgt 238 bp.

Targetsequenz des 16S rRNA Gens SEQ. ID. NO. 47

35 (Forward-Primer #1053) 5'-GCATGGCTGTCGTCAGCTC-3' aus

CTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAA 1082 GAAGCCCTTGGCACTCTGTCCACGACGTCCGACAGCAGCAGCACACTTT

Sequence Idenifier Number 48: (Sonde #1090)

5'-Fam-TTAAgTCCCgCAACgAgCgCAAC-Tamra-3' aus
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCC 1137
ACAACCCAATTCAGGGCGTTGCTCGCGTTGGGAATAGGAAACAACGGTCGCCAGG
GGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC 1192
CCGGCCCTTGAGTTTCCTCTGACGGTCACTATTTGACCTCCTTCCACCCCTACTG
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCAT 1247
CAGTTCAGTAGTACCGGGAATGCTGGTCCCGATGTTGCACGATGTTACCGCGTA
ACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTC 1302
TGTTTCTCTTCGCTGGAGCGCTCTCGTTCGCCTGGAGTATTTCACGCAGCATCAG

Sequence Identifier Number 49: 3'-TCGTTCGCCTGGAGTATTT-5' (Reverse-Primer #1270)

Lokalisation der Primer und der Sonde für den spezifischen Nachweis für Enterobacteriaceae: Dargestellt ist ein Ausschnitt der für die 16S rRNA codierenden Sequenz. Die Ziffern am rechten Rand der Sequenz geben die Position des jeweils letzten in einer Zeile stehenden Nukleotids an. Die Positionen beziehen sich auf die von Brosius et al. (1978) veröffentlichte Sequenz. Die Primer und die Sonde sind entsprechend ihrer Position im 16S rRNA-Gen aufgeführt. FAM: Fluorescein-Derivat als Reporter, TAMRA: Tetramethylrhodamin-Derivat als Quencher.

25

30

35

20

Beispiel 28

PCR-Bedingungen für den Nachweis von Enterobacteriaceae

Zusammensetzung und Komponenten des TaqMan-PCR-Reaktionsansatzes für den Nachweis von Enterobacteriaceae:

In Spalte eins sind die einzelnen Komponenten des PCR-Reaktionsamsatzes aufgelistet. Die eingesetzten Volumina pro Reaktionsansatz sind in Spalte zwei aufgeführt, während Spalte drei die finale Konzentration der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz wiedergibt. In Spalte vier sind die Stoffmengen der einzelnen Komponenten für eine 50 µl-PCR angegeben. UNG: Uracil-N-Glycosylase.

Komponente	Volumen	finale Konzentration	Stoffmenge
Template (DNA) Aqua bidest. 10x TaqMan-Puffer A 25 mM MgCl ₂	5.00 µl 11.25 µl 5.00 µl 7.00 µl	0.1 fg/µl - 20pg/µl / 1x	(in 50µl) 5fg-1ng / /
1,25 mM dATP 1,25 mM dCTP 1,25 mM dGTP 2,50 mM dUTP 3 µM Forward-Primer	2.00 µl 2.00 µl 2.00 µl 2.00 µl 5.00 µl	3.5 mM 50 µM 50 µM 50 µM 0.1 mM 0.3 µM	175 nmol 2.5 nmol 2.5 nmol 2.5 nmol 5.0 nmol
#1053 3 µM Reverse-Primer #1270 2 µM Sonde #1090	5.00 µl 3.00 µl	0.3 μM 0.12 μM	15.0 pmol 15.0 pmol 6.0 pmol
5 U/μl AmpliTaq Gold 1 U/μl AmpErase UNG	0.25 μl 0.50 μl Σ 50.0 μl	25 mU/μl 10 mU/μl	1.25 U 0.5 U

Folgendes PCR-Zyklenprofil wurde für den Nachweis von Enterobacteriaceae erstellt:

Schritt	Dauer In min	Temperatur In °C	Wiederholungen
Halten1	2	50	1
Halten 2	10	95	i
Cyclus 1	1/4	95	40
	1	60	.•
Halten 3	2	25	1

PCR-Profil für den Nachweis von Enterobacteriaceae.

5

10

In Spalte eins sind die einzelnen Komponenten des PCR-Reaktionsamsatzes aufgelistet. Die eingesetzten Volumina pro Reaktionsansatz sind in Spalte zwei aufgeführt, während Spalte drei die finale Konzentration der einzelnen Komponenten im Reaktionsansatz wiedergibt. In Spalte vier sind die Stoffmengen der einzelnen Komponenten für eine 50 µl-PCR angegeben. UNG: Uracil-N-Glycosylase.

Beispiel 29

15 Selektivität zum Nachweis von Enterobacteriaceae:

Die gram-negative Familie der Enterobacteriaceae gehört zur Gamma-Gruppe der Proteobacteria (Balows et al. 1991, Holt 1989). Zu den Proteobacteria gehören außerdem die Mitglieder der Alpha-, der Beta-, der Delta-, und der Epsilon-Gruppe

sowie Amoebobacter und einige unklassifizierte Proteobacteria. Abbildung 9 zeigt ein vereinfachtes taxonomisches Schema zur Einordnung der Enterobacteriaceae.

Die Ähnlichkeit von DNA-Sequenzen verschiedener Spezies steigt in der Regel mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad. Die Möglichkeit einer nicht-erwünschten Kreuzreaktion ist deshalb bei nah-verwandten Spezies wahrscheinlicher, als bei weniger verwandten Spezies. Die Spezifität des entwickelten PCR-Schnelltests zum Nachweis von Enterobacteriaceae wurde deshalb vor allem an genomischer DNA von nahen Verwandten der Enterobacteriaceae untersucht.

Dreißig verschiedene Enterobacteriaceae-Arten und vierzehn nicht zu den Enterobacteriaceae zählende Bakterienarten wurden überprüft.

Alle getesteten Gattungen der Enterobacteriaceae wurden durch den entwickelten PCR-Schnelltest erfaßt. Die mit Enterobacteriaceae stark verwandten Bakterien, zu denen insbesondere die Vertreter der Gamma-Gruppe zu zählen sind, als auch kaum verwandte Bakterien, vor allem die Vertreter der Firmicutes (gram positive-Bakterien), zeigten dagegen keine Reaktion mit dem System.

Liste der getesteten Enterobacteriaceae:

10

15

20

Jeweils 1 ng genomische DNA der in Spalte eins aufgeführten Spezies der Enterobacteriacea wurden zur Spezifitätsprüfung eingesetzt. Die verwendeten Stämme können Spalte zwei entnommen werden. In Spalte drei ist das Resultat der jeweiligen Untersuchung als + (positive Reaktion) bzw. - (negative Reaktion) mit dem PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae angegeben.

Arten der Familie Enterobacteriaceae	Stämme	Resultat (+/-)
Budvicia aquatica Buttiauxella agrestris Cedecea davisae Citrobacter freundii Edwardsiella tarda Enterobacter cloacae Erwinia amylovora Escherichia coli Ewingella americana Hafnia alvei Klebsiella pneumoniae Kluyvera ascorbata Leclercia adecarboxylata Leminorella grimontli Levinea malonatica	DSM 5075 DSM 4586 DSM 4568 DSM 30040 DSM 30052 DSM 30054 DSM 30165 ATCC 8739, DSM 301, DSM 787 DSM 4580 DSM 30163 DSM10031 DSM 4611 DSM 5077 DSM 5078 DSM 4596	+ + + + + + + + + +

WO 99/58713	49	PCT/DE99/01471
Moellerella wisconsensis	DSM 5076	+
Morganella morganii	DSM 30164	+
Pantoea agglomerans	DSM 3493	+
Photorhabdus luminescens	DSM 3368	+
Pragia fontium	DSM 5563	+
Proteus mirabilis	DSM 788	+
Providencia stuartii	DSM 4539	+
Rhanella aquatilis	DSM 4594	+
Salmonella typhimurium	ATCC 13311	+
Serratia marcescens	DSM 3370	+

Liste der getesteten Bakterienstämme, die nicht den Enterobacteriaceae

DSM 4782

DSM 5000

DSM 3370

DSM 4780

zugerechnet werden:

10

Shigella flexneri

Xenorhabdus

nematophilius

Tatumella ptyseos

Yersinia enterocolitica

Jeweils 2 ng genomische DNA der in Spalte eins aufgeführten Bakterienspezies wurden zur Spezifitätsprüfung eingesetzt. Die Zugehörigkeit der jeweiligen Spezies zu einer bestimmten Überordnung zeigt Spalte 2. Die verwendeten Stämme können Spalte drei entnommen werden. In Spalte vier ist das Resultat der jeweiligen Untersuchung als + (positive Reaktion) bzw. - (negative Reaktion) mit dem PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae angegeben.

Nah verwandte Arten der Enterobacteriaceae	Einordnung	Stamm	Resultat (+/-)
Acetobacter pasteurianus	Gamma-Gruppe	DSM 3509	-
Acinetobacter calcoaceticus	Gamma-Gruppe	DSM 6962	-
Aeromonas enteropelogenes	Gamma-Gruppe	DSM 6394	-
Alcaligenes faecalis	Beta-Gruppe	DSM 30030	-
Chromobacterium violaceum	Beta-Gruppe	DSM 30191	_
Enterococcus faecalis	Firmicutes	ATCC 29212	-
Halomonas elongata	Gamma-Gruppe	DSM 2581	-
Helicobacter pylori	Epsilon-Gruppe	DSM 4867	-
Listeria monocytogenes	Firmicutes	DSM 20600	-
Micrococcus luteus	Firmicutes	DSM 1605	-
Pseudomonas aeruginosa	Gamma-Gruppe	DSM 3227	_
Staphylococcus aureus	Firmicutes	ATCC 6538P	
Staphylococcus epidermidis	Firmicutes	ATCC 12228	-
Vibrio proteolyticus	Gamma-Gruppe	DSM 30189	-

5

Beispiel 30

Sensitivität des PCR-Schnelltests

Für die Experimente zur Bestimmung der Sensitivität des PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurde stellvertretend für die übrigen Enterobacteriaceae genomische *Escherichia coli*-DNA vom Stamm ATCC 8739 eingesetzt. Die Detektionsbreite des entwickelten PCR-Schnelltest für Enterobacteriaceae reicht nach diesen Untersuchungen von weniger als 5 KBE (entspricht 25 fg genomischer DNA) bis über 5000000 KBE (entspricht 25 ng genomischer DNA) *Escherichia coli* (Abbildung 10).

No-Template-Kontrollen (ohne Enterobacteriaceae-DNA) zeigen auch nach 40 Zyklen keine Reaktion mit dem entwickelten PCR-Schnelltest.

Beispiel 31

Produktanalyse

Steriles Wasser für Injektionszwecke (WFI, Charge 63022) wurde untersucht. Das Untersuchungsergebnis ergab Abwesenheit von Enterobacteriaceae-DNA.

Beispiel 32

Fehlvarianten in den Primer- und Sondensequenzen

Als Fehlvarianten werden die Primer- / Sondenkombinationen definiert, die die Target-DNS-Sequenzen mit nicht zufriedenstellender Spezifität (<100%) und Sensitivität (<70%) detektieren, wie die in Beispiel 27 angegebenen Sequenzen.

Literatur für die Beispiele:

25 Balows, A., Truper, H., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H. (1991)

The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Second Edition,

Vol 1-4, Springer-Verlag, New York NY

Brosius, J., Palmer, J. L., Kennedy, J.P. & Noller, H.F. (1978)

Complete Nucleotide Sequence of a 16S Ribosomal RNA Gene from Escherichia coli

30 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4801-4805

Holt, J. (editor in chief) (1989) Bergey's Manual of Systematic Becteriology, First Edition, Vol 1-4, Williams & Williams, Baltimore MD

Legenden zu den Abbildungen

Legende zur Abb. 1:

Die DNA (10 ng pro Spur, 2-14) aller eingesetzten S. aureus Stämme (Lane 2-5) wurde von den cap8-0 Primern (# 15297 und # 15485) detektiert. Dem gegenüber wurde die DNA einer nahe verwandten Staphylococcus Art. S-. epidermidis (Lane 6), und die anderer bakterieller Gattungen (Lane 7-11) nicht detektiert. Pilz, Fisch und menschliche DNA (Lane 12-14) wurden als Kontrollen eingesetzt und ergaben kein Detektionssignal. NTC (= no template control) ist die Wasserkontrolle, in der keine DNA eingesetzt wurde.

10

15

20

Legende zur Abb. 6:

Die DNA (1 - 10 ng) aller eingesetzten Bakterien (Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa und Streptococcus faecalis) wurde von dem 16S rRNA Primer/Sonden Set detektiert. Wurde genomische DNA (10 ng) von Pilzen (Neurospora crassa), Pflanzen (Arabodopsis thaliana) oder vom Menschen (Human, Perkin Elmer ABI, 401846) eingesetzt, so entsprach die gemessene Fluoreszenzstrahlung der Wasserkontrolle (no DNA control).

Legende zur Abb. 7

Fluoreszenzstrahlung in Abhängigkeit von der Menge an eingesetzter Salmonella DNS. In dem PCR-Schnelltest wurden Salmonella DNS Mengen eingesetzt, die aus 1-3, 50, 500 usw. Keimen isoliert wurde. Die Menge an freiwerdender Fluoreszenz wird als sogenannter RQ Wert angegeben.

$$RQ = (R^+/Q) - (R^-/Q)$$

25

Legende zur Abb. 8:

Wasser für Injektionszwecke (10 ml Analysenvolumen) wurde jeweils in vier unabhängigen Experimenten auf die Gegenwart von Bakterien analysiert. Als positive Kontrolle wurden 250 fg genomischer Salmonella DNS eingesetzt (Abb. 8, ganz links). Parallel wurde das Prüfprodukt mit 50 KBE / 10 ml Salmonella gespikt und dann analysiert (jeweils rechts). Es werden die Einzelergebnisse dargestellt.

Legende zur Abb. 9:

Schematische Darstellung taxonomischer Beziehungen der Enterobacteriaceae:

Die einzelnen Gattungen der Enterobacteriaceae gehören zur Gamma-Gruppe der Proteobacteria. Diese sind eingegliedert in die Eubacteria. Aus diesem Schema ergaben sich die Überlegungen zu den Spezifitätsprüfungen. Zum Nachweis der Spezifität des entwickelten PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae wurden hauptsächlich Vertreter der Gamma-Gruppe und einige Mitglieder anderer Gruppen der Proteobacteria herangezogen.

10 Legende zur Abb. 10:

Sensitivität des PCR-Schnelltests für Enterobacteriaceae:

Dargestellt sind die erhaltenen Ct-Werte in Abhängigkeit der eingesetzten keimbildenden Einheiten (KBE) Enterobacteriacea.

Patentansprüche:

	1. Te	stkit zum Nachweis mikrobieller Verunreinigungen nicht steriler Produkte,
	insbesond	ere nach GMP-Richlinien, auch Kosmetika und Lebensmittel, umfassend
5	mindesten	s ein DNA-Fragment, das die folgenden SEQ ID und Spacer (Abstandhalter)
	umfaßt:	
	(a)	einen Forward-Primer (SEQ ID Forward-Primer);
	(b)	eine Sonde (SEQ ID Sonde);
	(c)	einen Reverse-Primer (SEQ ID Reverse-Primer);
10	(d)	gegebenenfalls einen Spacer zwischen Forward-Primer und Sonde,
	(e)	gegebenenfalls einen Spacer zwischen Sonde und Reverse-Primer,
	(f)	gegebenenfalls einen Spacer upstream des Forward-Primers
	(g)	gegebenenfalls einen Spacer downstream des Reverse-Primers
		 wobei die SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID Sonde);
15		und (SEQ ID Reverse-Primer)] auch Varianten umfassen, bei denen
		eine, zwei oder drei Nukleotide substituiert, deletiert und / oder
		insertiert sind,
		dabei hat die Variante im wesentlichen dieselbe Funktion wie
		die Sequenz der SEQ ID [(SEQ ID Forward-Primer); (SEQ ID
20		Sonde); und (SEQ ID Reverse-Primer)].
		bei Sonden die Funktion der Bindung an DNA und
		bei Primern die Funktion der Bindung an DNA und die
		Bereitstellung eines verlängerbaren 3' Endes für die DNA-
		Polymerase;
25		 wobei die Spacer 0-40 Nukleotiden umfassen,

das DNA-Fragment genommen aus der Gruppe

(i) für Staphylococus aureus
SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer
(ii) für Pseudomonas aeruginosa
SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und
SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

- (iii) für Escherichia coliSEQ. ID. NO. 12 als Forward-PrimerSEQ. ID. NO. 13 als Sonde undSEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer
- 5 (iv) für Salmonella ssp.

SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer

- (v) für Bakterien
- SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und
 - SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer
 - (vi) für Enterobacteriaceae

SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer

15 SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer oder

- (vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)
 - SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer
- 20 SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

25

- 2. Verfahren zur Detektion von Mikroorganismen in Produkten, insbesondere Arzneimitteln oder Kosmetika, welches Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:
- a) Einsetzen von Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden mit den entsprechenden Sequenzen und deren Variationen,
- 30 (i) für Staphylococus aureus

SEQ. ID. NO. 6 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 7 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 8 als Reverse-Primer

- (ii) für Pseudomonas aeruginosa
- 35 SEQ. ID. NO. 9 als Forward-Primer
 - SEQ. ID. NO. 10 als Sonde und

(iii) für Escherichia coli

SEQ. ID. NO. 12 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 11 als Reverse-Primer

SEQ. ID. NO. 13 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 14 als Reverse-Primer

(iv) für Salmonella ssp.

SEQ. ID. NO. 15 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 16 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 17 als Reverse-Primer

für Bakterien 10 (v)

5

15

30

SEQ. ID. NO. 18 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 19 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 20 als Reverse-Primer

(vi) für Enterobacteriaceae

SEQ. ID. NO. 44 als Forward-Primer

SEQ. ID. NO. 46 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 45 als Reverse-Primer oder

(vii) für Enterobacteriaceae (16S rRNA)

SEQ. ID. NO. 47 als Forward-Primer

20 SEQ. ID. NO. 48 als Sonde und

SEQ. ID. NO. 49 als Reverse-Primer

oder weiterhin all die Sequenzen, welche komplementär zu den vorherigen Sequenzen SEQ ID NO 6 bis 49 sind.

- Vervielfältigen der DNA mit PCR; und 25 b)
 - C) Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen, die den Fluoreszenzfarbstoff anregen.
 - d) Messung und Quantifizierung der Emission des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Herstellung der Sonden auf der TaqMan-Detektionstechnologie beruht.

Abb. 1

Abb. 1

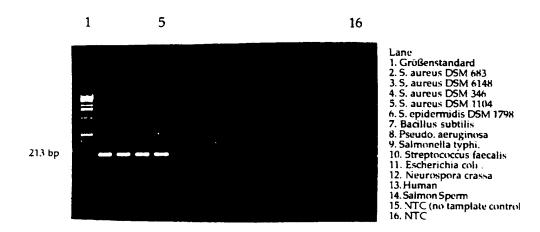


Abb. 2

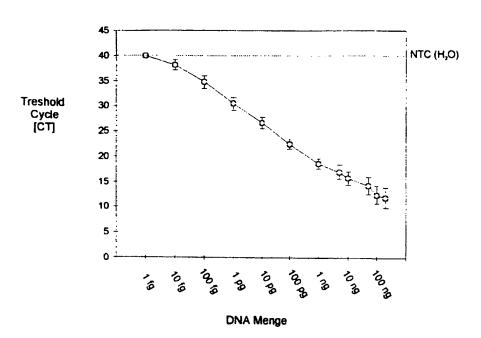
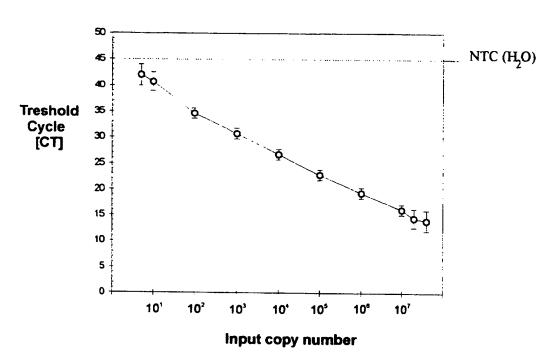


Abb. 3



Аьь. 4 Escherichia coli murA Amplification

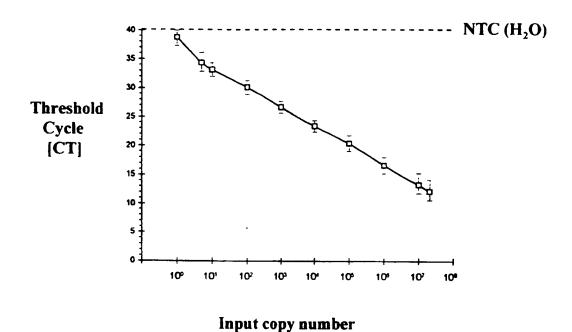


Abb. 5
Salmonella sp. invA Amplification

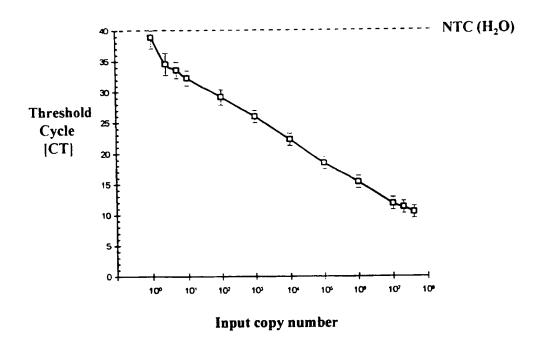


Abb. 6

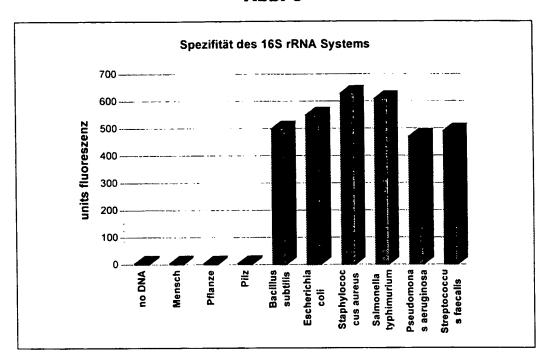


Abb. 7

Sensitivität des PCR Tests delta RQ 5 4,5 4 3,5 3 2,5 2 1,5 1 0,5 5000000 1-3 50 500 5000 50000 500000

KBE Salmonella

Abb. 8

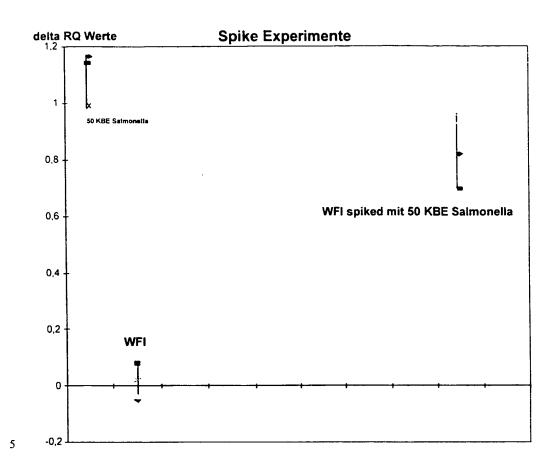
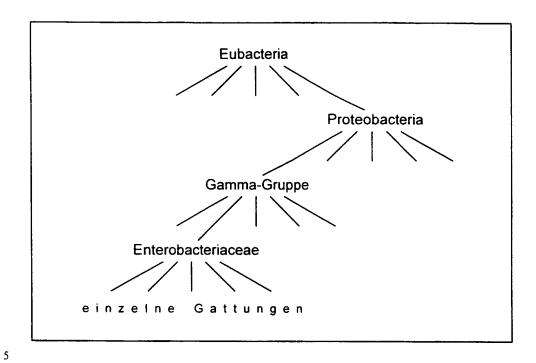
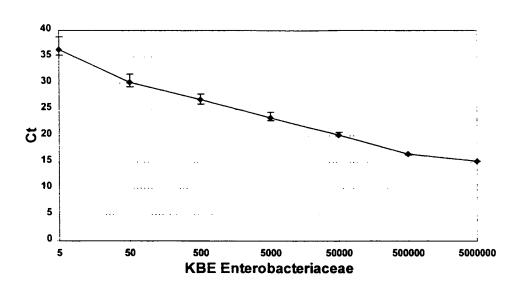


Abb. 9



WO 99/58713 10/10 PCT/DE99/01471

Abb. 10



	(1)	ALLGEMEINE ANGABEN					
	(i)	ANMELDER:					
	(A)	NAME:	SCHE	RING AKT	IENGESELLS	CHAFT	
5	(B)	STRASSE:		ERSTRAS		· · · · · ·	
	(C)	ORT:		BERLIN			
	(E)	LAND:		SCHLAND			
	(F)	POSTLEITZAHL:					
	(ii)	BEZEICHNUNG D			Verfahren	zur Datal	ktion von
10	(,				n in Produkte		KUOII VOII
••	(iii)	ANZAHL DER SEG		•			
	(iv)	COMPUTERLESB			requenzproto	KOIIE	
	(A)	DATENTREÄGER		DISKETTE	:		
	• •	COMPUTER:	•	486/INTEL			
15		BETRIEBSSYSTE	N.A.		•		
13	(D)		IVI.	WINWORE			
	(V)	DATEN DER JETZ	MGEN A		•		
	(٧)	DATEN DEN JE12	IGEN /	ANNIELDUN	IG .		
20	ART I STRA TOPO HYPO	Ille SEQ ID NO 1 bis DER SEQUENZ: NGFORM: DLOGIE: DTHETISCH: SENS:	Nukled	otidsequenz strangform			
30	ART I	ANGABEN ZU SEQ SEQUENZKENNZEI JENZLÄNGE: DES MOLEKÜLS: PRÜNGLICHE HERKL KMAL:	ICHEN	214 Nukleo Primer-Son Staphyloco	de-Primer	taphylococcu	is aureus
		JENZBESCHREIBUNG		ID NO: 1:			io dalcas
		GCACGT ACTGCTGA ATAGAG ACGTGAAT					_
35		AATTTG CAATAACT					=
		GAAATG GCAAACAA					
		CTGGTC CAGGAGTA	AGG CG	GTCATTGT	TTAGCTGTTG		
	ATCC	GTACTT TATT				21	4
40	ART	ANGABEN ZU SEQ SEQUENZKENNZE JENZLÄNGE: DES MOLEKÜLS:	ICHEN 310 N Prime	ukleotide r-Sonde-Prin	ner		
45		PRÜNGLICHE HERKL KMAL:			us aureus ner für Pseudon	nonas aerudi	nosa
73		JENZBESCHREIBUN			iei iui r scuuoii	ionas aerugi	11054

ART DES MOLEKÜLS: Primer-Sonde-Primer
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Bakterien

MERKMAL: Primer-Sonde-Primer für Bakterien
SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:
GCATGGCTGT CGTCAGCTCG TGTTGTGAAA TGTTGGGTTA 040
AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTATCCTT TGTTGCCAGC 080
GGTCCGGCCG GGAACTCAAA GGAGACTGCC AGTGATAAAC 120

TGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAGTCAT CATGGCCCTT 160
ACGACCAGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGCATACAAA 200

GCGAACGGCG AAGCGTACTG GAAAGGGAAA GCCAGCTTTA 280

356 Nukleotide

310

CGGTTCCTTT GACGGTGCGA TGAAGTTTAT

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

SEQUENZKENNZEICHEN

40

(2)

SEQUENZLÄNGE:

(i)

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

3

GAGAAGCGAC CTCGCGAGAG CAAGCGGACC TCATAAAGTG 240 CGTCGTAGTC CGGATTGGAG TCTGCAACTC GACTCCATGA 280 AGTCGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGA ATGCCACGGT 320 GAATACGTTC CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCA 356

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

SEQUENZKENNZEICHEN (i)

SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS:

Primer cap-8 forward # 15297*) MERKMAL: Primer cap-8 forward # 15297*) 10

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AGATGCACGT ACTGCTGAAA TGAG

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7: (2) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide

ART DER SEQUENZ: STRANGFORM:

Nukleotidsequenz Einzelstrangform

TOPOLOGIE:

linear

HYPOTHETISCH: 20

nein nein

ANTISENS: ART DES MOLEKÜLS:

Sonde cap-8 # 15460*

MERKMAL:

Sonde cap-8 # 15460*, als reverse complement eingesetzt, TAMRA vor und FAM nach der Sequenz

020

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCTGGTCCAG GAGTAGGCGG

(2)ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE:

26 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Primer cap-8 reverse # 15485

MERKMAL:

Primer cap-8 reverse # 15485* als reverse complement

026

eingesetzt

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

35 GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TTTATT

> (2)ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9: SEQUENZKENNZEICHEN

(i) SEQUENZLÄNGE:

23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: 40

Primer algQ forward # 876* Primer algQ forward # 876*

MERKMAL: SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CTTCGATGCC CTGAGCGGTA TTC

023

024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10: 45

SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

26 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Sonde algQ # 911

MERKMAL:

50

Sonde algQ # 911, FAM vor und TAMRA nach der

Sequenz

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCAACGCCGA AGAACTCCAG CATTTC

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

4

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Reverse Primer Sequence (# 1147):

MERKMAL:

Primer algQ reverse # 1147* als reverse complement

eingesetzt

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CTGAAGGTCC TGCGGCAACA GTT

023

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

24 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Forward Primer Sequence (# 767*):

MERKMAL:

Forward Primer Sequence (# 767*):

15 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GTTCTGTGCA TATTGATGCC CGCG

024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

20 SEQUENZLÄNGE:

23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Sonde (# 802)

MERKMAL:

Sonde (# 802), FAM vor und RAMARA nach der Sequenz

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

TCTGCGCACC TTACGATCTG GTT

023

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

24 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Reverse Primer Sequence (# 884)

30 MERKMAL:

Reverse Primer Sequence (# 884)als reverse complement

eingesetzt

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GCAAGTTTCA CTACCTGGCG GTTG

024

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

24 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Forward Primer Sequence (# 269*)

MERKMAL:

Forward Primer Sequence (# 269*)

40 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GTGAAATTAT CGCCACGTTC GGGC

024

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN IS SEQUENZLÄNGE: 24 Nu

24 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Sonde (# 333)

MERKMAL:

Sonde (# 333), FAM vor und TAMARA nach der Sequenz

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CTTCTCTATT GTCACCGTGG TCCA

024

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

24 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Reverse Primer Sequence (# 542)

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

5

019

MERKMAL: Reverse Primer Sequence (# 542) als reverse

complement eingesetzt

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GGTTCCTTTG ACGGTGCGAT GAAG 024

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Primer 16S rRNA forward # 1053* MERKMAL: 10 Primer 16S rRNA forward # 1053*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

GCATGGCTGT CGTCAGCTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

15 (i) **SEQUENZKENNZEICHEN**

SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde 16S rRNA # 1090

MERKMAL: Sonde 16S rRNA # 1090, FAM vor und TAMARA nach der

Sequenz

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19: 20

TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC 023

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

SEQUENZKENNZEICHEN (i)

25 SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide

> ART DES MOLEKÜLS: Primer 16S rRNA reverse # 1386* MERKMAL: Primer 16S rRNA reverse # 1386*

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

TGACGGCCG TGTGTACAAG 020

30

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Sonde

MERKMAL: Sonde von Salmonella ssp

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

TTTGTTATTG GCGATAGCCT GGC 023

(2)ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN

23 Nukleotide SEQUENZLÄNGE:

ART DES MOLEKÜLS: Sonde

MERKMAL: Sonde von Salmonella ssp.

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

TTCTCTGGAT GGTATGCCCG GTA 023

(2)ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE:

25 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Reverse Primer

MERKMAL: Reverse Primer für Staphylococcus aureus

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

CATTGTTTAG CTGT TGATCC GTAC T 025

5	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24: (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Forward Primer für Staphylococcus aureus SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24: GCACGT ACTG CTGAAA TGAG TAAG 024
10	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25: (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Forward Primer für Pseudomonas aeruginosa SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:
15	CAGGCCTTCG ATGCCCTGAG C 021
20	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26: (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Reverse Primer für Pseudomonas aeruginosa SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26: GCTGAAGGTC CTGCGGCAAC AG 022
25	(=) (=) (=) (=) (=) (=) (=) (=) (=) (=)
	(i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide
30	SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Forward Primer für E. coli SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27: TAGAACGTAA TGGTTCTGTG CAT 023
35	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28: (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Reverse Primer für <i>E. coli</i> SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28: CTGGCCTCGA ACAATTAGGC GCG 023
40	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:
45	(i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Forward Primer für Bakterien SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:
	TGCATGGCTG TCGTCAGCTC 020
50	(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30: (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Sonde MERKMAL: Sonde für Bakterien allgemein SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

027

7 TTGGGTTAAG TCCCG CAACG AGC 033 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31: **SEQUENZKENNZEICHEN** (i) SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Forward Primer für Staphylococcus aureus SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31: ATGCACGTAC TGCTGAAATG AG 032 10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32: SEQUENZKENNZEICHEN (i) SEQUENZLÄNGE: 26 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Sonde MERKMAL: Sonde für Staphylococcus aureus SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32: **AACACATATA GAGACGTGAA TATTGC** 035 ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33: 20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 22 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Reverse Primer für Staphylococcus aureus SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33: 25 GTTTAGCTGT TGATCCGTAC TT 022 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34: (i) **SEQUENZKENNZEICHEN** SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Sonde MERKMAL: Sonde für Pseudomonas aeruginosa SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34: CAATTGCTGC TGGACTATGT ATCTG 025 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35: SEQUENZKENNZEICHEN (i) SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer MERKMAL: Forward Primer für Pseudomonas aeruginosa SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35: 40 CAACGCCGAA GAACTCCAGC ATTTC 025 ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36: (i) **SEQUENZKENNZEICHEN** SEQUENZLÄNGE: 27 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Sonde MERKMAL: Sonde für Pseudomonas aeruginosa SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) **SEQUENZKENNZEICHEN**

SEQUENZLÄNGE:

22 Nukleotide Primer

AACGCCGA AG AACTCCAG CA TTTCTGC

ART DES MOLEKÜLS:

Reverse Primer für Escherichia coli MERKMAL: SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37: CATTTCTGGC CTCGAACAAT TA 022 ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38: (2) SEQUENZKENNZEICHEN (i) 23 Nukleotide SEQUENZLÄNGE: ART DES MOLEKÜLS: Sonde Sonde für Escherichia coli MERKMAL: SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38: 023 CCGCTGGTAG CGCGTTTTGG TCA ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39: (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 23 Nukleotide 15 ART DES MOLEKÜLS: Primer Forward Primer für Escherichia coli MERKMAL: SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39: 023 ATGAAGCTGC TAAGCCAGCT GGG 20 ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40: (2) SEQUENZKENNZEICHEN (i) SEQUENZLÄNGE: 25 Nukleotide Primer ART DES MOLEKÜLS: Forward Primer für Salmonella ssp MERKMAL: SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40: TTGAAGCCGA TGCCGGTGAA ATTAT 025 ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41: (2) **SEQUENZKENNZEICHEN** 30 (i) SEQUENZLÄNGE: 24 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Sonde MERKMAL: Sonde für Salmonella ssp SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41: TITGTTGTCT TCTCTATTGT CACC 024 ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42: (2) SEQUENZKENNZEICHEN (i) SEQUENZLÄNGE: 20 Nukleotide Primer ART DES MOLEKÜLS: 40 MERKMAL: Reverse Primer für Bakterien allgemein SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42: 020 **AAGTCGTAAC AAGGTAACCA** (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43: 45 (i) SEQUENZKENNZEICHEN SEQUENZLÄNGE: 21 Nukleotide ART DES MOLEKÜLS: Primer Forward Primer für Bakterien allgemein MERKMAL: SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43: **GGATTAGATA CCCTGGTAGT C** 021 ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44: (2)

SEQUENZKENNZEICHEN

(i)

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

9

ART DES MOLEKÜLS: Forward-Primer (#1053) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae

Forward-Primer (#1053) für Enterobacteriaceae

20 Nukleotide

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

GCATGGCTGT CGTCAGCTC

20

- (2)ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:
- **SEQUENZKENNZEICHEN** (i)
- SEQUENZLÄNGE: 10

SEQUENZLÄNGE:

20 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Reverse-Primer (#1270)

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae

MERKMAL:

(2)

Reverse-Primer (#1270) für Enterobacteriaceae

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

TTTATGAGGT CCGCTTGCTC

45

- SEQUENZKENNZEICHEN (i)

SEQUENZLÂNGE:

23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

Sonde (#1090)

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae

Sonde (#1090)

für Enterobacteriaceae

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC

23

25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:
- **SEQUENZKENNZEICHEN** (i)

SEQUENZLÄNGE:

19 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

(Forward-Primer #1053)

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Targetsequenz des 16S rRNA Gens von 30

Enterobacteriaceae

MERKMAL:

(Forward-Primer #1053) für Enterobacteriaceae

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

GCATGGCTGT CGTCAGCTC

19

35

- (2)ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:
- **SEQUENZKENNZEICHEN** (i)

SEQUENZLÄNGE:

23 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

(Sonde #1090) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae

MERKMAL:

(Sonde #1090) für Enterobactereaceae

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AAC

23

45

- (2)ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:
- SEQUENZKENNZEICHEN (i)

SEQUENZLÄNGE:

19 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS:

(Reverse-Primer #1270)

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Enterobacteriaceae

MERKMAL:

(Reverse-Primer #1270) für Enterobacteriaceae

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

TCGTTCGCCT GGAGTATTT

WO 99/58713 PCT/DE99/01471

	(2) ANGABEN ZU SEQ ID (i) SEQUENZKENNZEICH		
		0 Nukleotide	
5	ART DES MOLEKÜLS: F	orward-Primer	
	URSPRÜNGLICHE HERKUNF	T: Enterobacteriaceae	
	MERKMAL: F	orward-Primer für Enterobacteriaceae als F	ehlsequenz
	SEQUENZBESCHREIBUNG:	SEQ ID NO: 50:	
	GTGCTGCATG GCTGTCGTC		20
10			
	(2) ANGABEN ZU SEQ ID		
	(i) SEQUENZKENNZEICH		
		3 Nukleotide	
		onde	
15	URSPRÜNGLICHE HERKUNF		
		onde für Enterobacteriaceae als Fehlseque	enz
	SEQUENZBESCHREIBUNG:		
	AGTCCCGCAA CGAGCGCA	AC CC	23
20	(2) ANCAREN ZU SEO ID	NO: E2:	
20	(2) ANGABEN ZU SEQ ID (i) SEQUENZKENNZEICH		
		3 Nukleotide	
	ART DES MOLEKÜLS: S		
	URSPRÜNGLICHE HERKUNI		
25		ionde für Enterobacteriaceae als Fehlseque	an7
23	SEQUENZBESCHREIBUNG:		51 IZ
	ATGTTGGGTT AAGTCCCGC	· ·	23
	(2) ANGABEN ZU SEQ ID	NO: 53:	
30	(i) SEQUENZKENNZEICH	HEN	
		0 Nukleotide	
	ART DES MOLEKÜLS: F		
	URSPRÜNGLICHE HERKUNI	FT: Enterobacteriaceae	
		orward-Primer für Enterobacteriaceae als F	ehlsequenz
35	SEQUENZBESCHREIBUNG:		
	GCTGTCGTCA GCTCGTGTT	Γ	20
	(2) ANGABEN ZU SEQ ID		
	(i) SEQUENZKENNZEICH		
40	SEQUENZLÄNGE: 2	1 Nukleotide	
	ART DES MOLEKÜLS: F		
	URSPRÜNGLICHE HERKUNI		
		Reverse-Primer für Enterobacteriaceae als f	-enisequenz
	SEQUENZBESCHREIBUNG:		
45	AACTTTATGA GGTCCGCTT	GC :	21